Wirkungsmechanismus, Spezifität und Bindungsstelle des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton

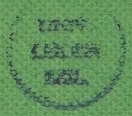
Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Dietmar Zdunek
aus Gladbeck

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0007

Wirkungsmechanismus, Spezifität und Bindungsstelle des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Dietmar Zdunek

aus Gladbeck

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.1984

Dekan	: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter	: Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. A. Wendel

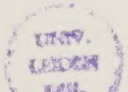
In Dankbarkeit gewidmet meinen Eltern

Abstract

Zdunek, Dietmar

Wirkungsmechanismus, Spezifität und Bindungsstelle des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton

Der vom Actinomyceten Streptomyces arenae synthetisierte Sekundär-Metabolit Pentalenolacton wirkt durch irreversible Hemmung des Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als Glykolyse-Inhibitor.
Durch Einsatz eines optimalen Nährmediums mit einer geeigneten fermentativen Prozeß-Führung und anschließender schonender Aufarbeitung kann Pentalenolacton aus Streptomyces arenae in ausreichender Quantität und Qualität dargestellt werden, wobei nicht so sehr den Nährstoff-Bedingungen entscheidende Bedeutung bei der Sekundär-Metabolit-Produktion zukommen, als vielmehr einer durch die Fermentation herbeigeführten charakteristischen Morphologie des Streptomyceten-Mycels.
Hierbei wurden 5 Pentalenolacton-Derivate mit unterschiedlicher GAPDH-Hemmaktivität isoliert, die durch Vergleich mit strukturell verwandten Verbindungen, Aussagen zuließen, welche Struktur-Elemente und stereochemischen Bedingungen innerhalb des Pentalenolacton-Moleküls für die irreversible Inhibitor-Wirkung bei GAPDH verantwortlich sind.
Dabei zeigen die Pentalenolactone strukturelle Verwandtschaft, als "bifunktionelle" Inhibitoren, zu den von Pflanzen synthetisierten Sesquiterpen-Lactonen, welche schon Anwendung als Enzym- und Tumor-Inhibitoren gefunden haben.
Jedoch steht im Gegensatz dazu die Wirkposition innerhalb des Enzyms, welche bei den von Pflanzen synthetisierten Sekundär-Metaboliten durch nucleophilen Angriff eines reaktiven Cystein-Restes erfolgt, wogegen die Pentalenolactone neben einem möglichen Arginin-Rest innerhalb der Substrat-Bindungsstelle einen Histidin-Rest im katalytischen Zentrum des Enzyms GAPDH zur irreversiblen Inhibitor-Wirkung benötigen. Dies erklärt auch die hohe Enzym-Spezifität des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton.



Für die mir zuteil gewordene hilfreiche Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen:

Herrn Professor Dr. D. Mecke danke ich für das Vertrauen in die Bewältigung der Lösung der uns interessierenden Fragen sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Dr. W. Oberrauch danke ich für die Einführung in die Methodik der HPLC und für die Aufnahme hochauflösender IR-Spektren.

Herrn Dipl.Biochem. K.-H. Maurer danke ich für die fruchtbare und konstruktive Diskussion sowie kameradschaftliche Teamarbeit bei der Lösung einiger Fragen des uns gleichermaßen interessierenden Forschungsgebietes des Sekundär-Metabolismus. Insbesondere danke ich für die chemische Synthese von Pentalenen und für die Zusammenarbeit bei der Isolierung von Pentalensäure.

Der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF, insbesondere Herrn Dr. J. Lehmann, danke ich für die Einführung in biotechnologische Verfahren, sowie für die kooperative Zusammenarbeit und weitere Betreuung der fermentativen Produktion von Pentalenolacton im halbtechnischem Maßstab.

Verzeichnis der verwendten Abkürzungen:

$GAPDH_{rm}$	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase: Kaninchen-Muskel
D-GAP	D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat
PL	Pentalenolacton
PL_c	Pentalenolacton-Chlorhydrin
PL_e	Pentalenolacton-Epoxid
PL_d-F	Pentalenolacton F-Diol
PL_d-H	Pentalenolacton H-Diol
PA	Pentalensäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
MES	2-(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin-Äthansulfonsäure
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
p-HMB	para-Hydroxymercuribenzoat
PALP	Pyridoxal-5'-Phosphat
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
BTM	Trockengewicht der gebildeten Biomasse
ß-ME	2-Mercaptoäthanol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
$Y_{B/S}$	Ausbeute an gebildeter Biomasse pro verbrauchtem Substrat
$Y_{P/S}$	Ausbeute an gebildetem Pentalenolacton pro verbrauchtem Substrat
ID_{50,PL_c}	Konzentration an Pentalenolacton-Chlorhydrin, die nach 60 min Inkubation eine 50%ige $GAPDH_{rm}$-Inhibition hervorruft
$ID_{50,X}$	strukturell verwandte Verbindung, die nach 60 min Inkubation eine 50%ige $GAPDH_{rm}$-Inhibition hervorruft

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
1.	Material und Methoden	5
1.1	Materialien	5
1.1.1	Enzyme	5
1.1.2	Coenzyme	6
1.1.3	Puffer-Substanzen	6
1.1.4	Radiochemikalien	6
1.1.5	Nährmedien	6
1.1.6	Modifizierungsreagentien	7
1.1.7	Materialien für Säulen-Chromatographie	7
1.1.8	Materialien für Isoelektrische Fokussierung und Gel-Elektrophorese	8
1.2	Organismus: Streptomyces arenae	9
1.3	Geräte	10
1.4	Allgemeine Methoden	12
1.4.1	Enzymatische Methoden	12
1.4.2	Protein-Bestimmung	12
1.4.3	Radioaktivitätsmessungen	12
1.4.4	Darstellung von NAD-freier $GAPDH_{rm}$	13
1.4.5	Aminosäure-Bestimmung nach saurer Peptid-Hydrolyse	13
1.4.6	Trockengewichtsbestimmung der gebildeten Biomasse	13
1.4.7	Elektrophoretische Methoden	14
1.4.7.1	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Disc Page)	14
1.4.7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen sowie anschl. Aktivitätsbestimmung über Fluoreszenzmessung	15
1.4.7.3	Isolelektrische Fokussierung	16
1.4.8	Proteolyse von PL_c-modifizierter und nativer $GAPDH_{rm}$	17

		Seite
1.4.8.1	Proteolyse mittels DCC-Trypsin	17
1.5	Spezielle Methoden	18
1.5.1.1	Experimente zur Irreversibilität der Bindung von Pentalenolacton an seinen Wirkort GAPDH	18
1.5.1.1.1	Denaturierung mit anschl. Renaturierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$	18
1.5.1.1.2	Gleichgewichtsdialyse	19
1.5.1.1.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen	19
1.5.1.1.4	Quantitativer Test auf Pentalenolacton Chlorhydrin	19
1.5.1.1.5	Bestimmung der Stöchiometrie der Reaktion von Pentalenolacton-Chlorhydrin mit $GAPDH_{rm}$	22
1.5.1.2	Modifizierungsexperimente an nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$	22
1.5.1.2.1	Bestimmung der SH-Gruppen nach Ellmann	22
1.5.1.2.2	Bestimmung der SH-Gruppen mittels p-HMB	23
1.5.1.2.3	Bestimmung sämtlicher freien α-Amino-Gruppen mittels TNBS	23
1.5.1.2.4	Bestimmung der reaktiven α-Amino-Gruppen von Lysin mittels PALP	23
1.5.1.2.5	Modifizierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ mittels Methylglyoxal	23
1.5.1.3	Experimente zum Einfluß der Cosubstrate NAD und ATP auf die Pentalenolacton-Hemmwirkung	24
1.5.1.3.1	Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem NAD und PL_c	24
1.5.1.3.2	Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem ATP und Pentalenolactone	25
1.5.1.4	Isolierung ^3H-PL_c-markierter tryptischer Peptide mittels analytischer HPLC	26

		Seite
1.5.2	Produktion und Isolierung von Pentalenolactone	27
1.5.2.1	Nährmedien u. Kulturbedingungen des Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae Tü 469	27
1.5.2.1.1	Schrägagar-Kultur	27
1.5.2.1.2	Submers-Vorkulturen	28
1.5.2.1.3	Submers-Kulturen für die Nährmedium-Optimierung	29
1.5.2.2	Fermentation von Streptomyces arenae	29
1.5.2.2.1	Enzymatische Bestimmung von D-Mannit	30
1.5.2.2.2	Isolierung von Mannit-Dehydrogenase aus Streptomyces arenae	30
1.5.2.2.3	Enzymatischer Test zur Konzentrationsbestimmung von D-Mannit	30
1.5.2.3	Isolierung von Pentalenolactone	31
1.5.2.3.1	Adsorption an Amberlite XAD-2	31
1.5.2.3.2	Äther-Extraktion der lipohilen Anteile	32
1.5.2.3.3	Gelfiltration an Sephadex LH-20	32
1.5.2.3.4	Präparative HPLC (reverse phase) von Pentalenolactone	33
1.5.3	Chemische Analysen	35
1.5.3.2	Analytische HPLC (reverse phase) der Pentalenolactone	35
1.5.4	Darstellung von Pentalenolacton-Derivate und strukturell verwandten Verbindungen	36
1.5.4.1	Darstellung von Pentalenen	36
1.5.4.2	Isolierung von Isocomensäure	36
1.5.4.3	Darstellung von D,L-Isoiridomyrmecin	36
1.5.4.4	Darstellung von Methylestern	36
1.5.4.5	Darstellung von 7,8 Dimethyl-5-(α-Hydroxy-ß-Chlorethyl)-6-Bicyclo-[3.3.0]-Octadien-(2.6)-3-Carbonsäure	37
1.5.4.6	Bestimmung der relativen $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität	37

		Seite
2.0	Ergebnisse	38
2.1	Experimente zur Irreversibilität der Bindung von Pentalenolacton an seinen Wirkort GAPDH	38
2.1.1	Denaturierung mit anschl. Renaturierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$	38
2.1.2	Gleichgewichtsdialyse	39
2.1.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen mit anschl. Aktivitätsbestimmung	41
2.1.4	Isolelektrische Fokussierung	42
2.2.1	Quantitativer Test auf Pentalenolacton-Chlorhydrin	43
2.2.2	Bestimmung der Stöchiometrie des Inhibitors PL_c mit seinem Wirkort $GAPDH_{rm}$	44
2.3.1	Experimente zur Enzym-Spezifität der Pentalenolacton-Wirkung	45
2.3.2	Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem NAD und PL_c	50
2.4	Modifizierungsexperimente an nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$	51
2.4.1	Bestimmung der SH-Gruppen in $GAPDH_{rm}$	51
2.4.1.1	Bestimmung der SH-Gruppen nach Ellmann	51
2.4.1.1.1	Bestimmung der Gesamt-Anzahl von SH-Gruppen	51
2.4.1.1.2	Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen	52
2.4.1.2	Bestimmung der SH-Gruppen mittels para-Hydroxymercuribenzoat	54
2.4.2	Bestimmung der Lysin-Reste in $GAPDH_{rm}$	56
2.4.2.1	Bestimmung der Gesamt-Anzahl an freien α-Amino-Gruppen	56
2.4.2.2	Bestimmung der reaktiven α-Amino-Gruppen von Lysin mittels Pyridoxal-5'-Phosphat	56

		Seite
2.4.3	Experimente zum Nachweis einer Beteiligung von Arginin-Resten bei der PL_c-Bindung an $GAPDH_{rm}$	59
2.4.3.1	Modifizierung von Arginin-Resten durch Methylglyoxal	59
2.4.3.2	Einfluß von Pentalenolacton-Chlorhydrin auf die proteolytische Wirkung von Clostripain	61
2.4.4	Isolierung und Identifizierung tritiummarkierter PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$-Peptide mittels HPLC	63
2.5	Nährmedium-Optimierung, Fermentation und Produkt-Isolierung bei dem Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae Tü 469	69
2.5.1	Nährmedium-Optimierung bei Streptomyces arenae Tü 469	69
2.5.1.1	Belüftungsoptimierung	69
2.5.1.2	pH-Optimierung	71
2.5.1.3	Optimierung der Phosphat-Konzentration	73
2.5.1.4	Optimierung der L-Asparagin-Konzentration	73
2.5.1.5	Optimierung der Calcium-Konzentration	75
2.5.1.6	Einsatz unterschiedlicher C-Quellen	75
2.5.2	Fermentation des Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae	79
2.6	Isolierung und Identifizierung von Pentalenolactone	82
2.7.1	Bestimmung der relativen $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität von isolierten Pentalenolacton-Derivate mit strukturell verwandten Verbindungen	92
2.7.2	Experimente zum reaktiven Verhalten der Pentalenolacton-Derivate PL_d-F und PL_c bei der $GAPDH_{rm}$-Inhibition	96
3.0	Diskussion	99
4.0	Literaturverzeichnis	113

A. Einleitung

Die besondere Fähigkeit von Mikroorganismen und Pflanzen eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Substanzen zu synthetisieren, welche als "sekundäre Metabolite" bezeichnet werden, machen sie zu leistungsfähigen Objekten von nicht zu unterschätzender wissenschaftlicher wie auch wirtschaftlicher Bedeutung.
Viele dieser Sekundär-Metabolite stellen als Antibiotica biologisch hochwirksame Substanzen dar, die schon in geringen Konzentrationen das Zellwachstum anderer Organismen hemmen können und sich je nach Anwendungsgebiet speziell in medizinischer Hinsicht als antimikrobielle Therapeutica oder als Cytostatica anwenden lassen.
Die Bildung dieser Art von Metaboliten ist bei Pilzen (Gattung: Aspergillus), den mycelbildenden Bakterien (Gattung: Streptomyces) und Eubakterien (Gattung: Bacillus) besonders stark ausgeprägt, jedoch werden auch schwerkultivierbare Bakterien z.B. aus marinem Lebensraum sowie Pflanzen auf antimetabolische Aktivitäten überprüft.
Die Sekundär-Metaboliten zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu den Primär-Metaboliten (Aminosäuren, Kohlehydrate etc.) nicht essentiell für das Wachstum und die Reproduktion der sie bildenden Organismen sind. Dies wirft die Frage nach der biologischen Funktion für den Produzenten auf, welche bislang nicht eindeutig geklärt ist.
Diskutiert werden Effekte auf den Primär-Stoffwechsel, die Regulation, den Stoff-Transport, die Differenzierung oder die Morphogenese (1, 2).

Die meisten zur Zeit bekannten Sekundär-Metabolite greifen selektiv in die Ausbildung organismen-spezifischer Zell-Strukturen oder deren lebensnotwendige Stoffwechselvorgänge ein: wie Zellwand-Synthese, Nucleinsäure- und Protein-Biosynthese sowie Energie-Haushalt (3) und fanden somit vor allem in der Therapie bakterieller Infektionen ihre Anwendung.
Weniger für die medizinische Therapie als für die biochemische Grundlagenforschung sind jedoch solche Sekundär-Metabolite von Interesse, welche durch gezielte Blockierung eines Stoffwechselweges Aufschluß über dessen Rolle im Gesamtstoffwechsel bzw. dessen Regulation in der Zelle liefern.
Sekundär-Metabolite, die spezifisch bestimmte Reaktionen innerhalb des Intermediär-Stoffwechsels inhibieren, konnten jedoch mit den klassischen Methoden des Antibiotica-Screenings nicht gefunden werden. Erst der Einsatz von chemisch definierten Medien zur Anzucht von Testorganismen brachte auf diesem Gebiet Erfolge und führte zur Entdeckung einer Vielzahl von Antimetaboliten (4).
Auf der Suche nach Aminosäure-Antimetaboliten (5, 6), Antimetaboliten mit möglicher Antitumor-Wirkung (7), Fungiziden (8, 9), Nucleinsäuresynthese-Inhibitoren (10) sowie Wachstum-Inhibitoren für säurefeste Bakterien (11) wurde in mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Antimetabolit entdeckt, der erstmals 1956 in der Literatur beschrieben wurde (8, 9). Die Struktur-Aufklärung gelang 1969 (7, 10) und konnte 1978 durch Total-Synthese bestätigt werden (12).

Als Name für diese Substanz wurde Pentalenolacton vorgeschlagen (10), von dem mehrere Modifikationen in Form des Pentalenolacton-Epoxid, -Diol und -Chlorhydrin mit ähnlichen antimikrobiellen Eigenschaften beschrieben sind (5, 11), wobei man in der älteren Literatur die Bezeichnungen Arenaemycin (5), PA-132 (8) und AA-57 (11) findet.
1971 stellte Lemke, J. fest, daß Pentalenolacton die Glykolyse hemmt (6). Die Untersuchungen von Hartmann, S. , 1978, zeigten daraufhin eindeutig, daß Pentalenolacton an der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) angreift (13).
Ebenfalls in neuester Zeit konnten mögliche Vorstufen von Pentalenolacton isoliert werden, die darauf hindeuten, daß die Biosynthese ausgehend von Pentalenen (14) über Pentalensäure (15) zum Pentalenolacton H und/oder G (16, 15) sodann zu weiteren Zwischenstufen wie Pentalenolacton E (17, 18), Pentalenolacton F (19) über den Sesquiterpen-Weg verläuft (20, 21, 22, 23).
Weiterhin sei an dieser Stelle auf Untersuchungen hingewiesen, welche das außerordentlich weite biologische Wirkungsspektrum des Sesquiterpen-Lactons Pentalenolacton aufzeigen, welches Prokaryonten (5, 9, 11) als auch Eukaryonten umfaßt (24), sowie auf Untersuchungen über die Regulation der Streptomyceten-GAPDH während der Pentalenolacton-Biosynthese (25).

Die bisher bekannten Ergebnisse führten zu weiteren Untersuchungen über die Pentalenolacton-Wirkung, da dieser Sekundär-Metabolit aus zweierlei Gründen eine exponierte Stellung innerhalb der Fülle von Sesquiterpen-Lactonen einnimmt.
Zum einen stellt er als irreversibeler Glykolyse-Inhibitor mit definiertem Wirkort ein wirkungsvolles Werkzeug zur Untersuchung von Regulationsphänomenen in biologischen Systemen dar.

Zum anderen zeigt er die Besonderheit eines von Actinomyceten produzierten Sesquiterpen-Lactons, eine Naturstoff-Klasse mit antimikrobiellen und tumorinhibierenden Fähigkeiten, deren Biosynthese ansonsten Pflanzen vorbehalten ist (26, 27). Anliegen vorliegender Arbeit wurde es somit, etwaige Parallelen und Unterschiede zum stereochemischen Wirkungsmechanismus von Pentalenolacton auf seinen Wirkort GAPDH (28) mittels Struktur-Aktivitäts=beziehungen zu untersuchen, wobei zwei zentrale Fragen beantwortet werden sollten:

1. Welche Struktur-Elemente innerhalb des Pentalenolacton-Moleküls sind für die irreversibele Inhibitor-Wirkung Bedingung?

2. Welche Aminosäure-Position bzw. stereochemischen Bedingungen sind innerhalb der Enzym-Struktur für die Bindung des Inhibitors erforderlich?

Die Beantwortung dieser Fragen gibt letztendlich Aufschluß über die außergewöhnliche Enzym-Spezifität des Sesquiterpen-Lactons Pentalenolacton.

1. Material und Methoden

1.1 Materialien

1.1.1 Enzyme

Alkohol-Dehydrogenase	(ADH)	, Hefe Pferde-Leber	: EC 1.1.1.1
Glutamat-Dehydrogenase	(GlDH)	, Rinder-Leber	: EC 1.4.1.3
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	(G6PDH)	, Hefe Leuconostoc mesenteroides	: EC 1.1.1.49
Lactat-Dehydrogenase	(LDH)	, Kaninchen-Muskel	: EC 1.1.1.27
Malat-Dehydrogenase	(MDH)	, Schweine-Herz	: EC 1.1.1.37
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	(6-PGDH)	, Hefe	: EC 1.1.1.44
Glycerin-Kinase	(GK)	, Candida mycoderma	: EC 2.7.1.30
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	(GDH)	, Kaninchen-Muskel	: EC 1.1.1.8
Isocitrat-Dehydrogenase	(ICDH)	, Schweine-Herz	: EC 1.1.1.42
3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	(3-HBDH)	, Rhodopseudo. spheroides	: EC 1.1.1.30
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase		, Schweine-Herz	: EC 1.1.1.35
Diaphorase		, Schweine-Herz	: EC 1.6.4.3
Triosephosphat-Dehydrogenase	(TIM)	, Kaninchen-Muskel	: EC 5.3.1.1
Glyoxalase I		, Hefe	: EC 4.4.1.5
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	(GAPDH)	, Hefe E. coli K12 (29) Kaninchen-Muskel	: EC 1.2.1.12
Clostripain		, Clostridium histolyticum	: EC 3.4.22.8
DCC-Trypsin		, Rinder-Pankreas	: EC 3.4.21.4

Alle Enzyme und ihre Substrate wurden von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen.

1.1.2 Coenzyme

Name	Hersteller	Reinheitsgrad
NAD, freie Säure	Boehringer	Grad II, 98%
NADP, di-Na-Salz	Boehringer	Grad II, 98%
ATP, di-Na-Salz	Boehringer	Grad II, 98%

1.1.3 Puffer-Substanzen

Name	Hersteller	Reinheitsgrad
MES, free acid	Calbiochem	A grade
MES, Na-salt	Calbiochem	A grade
HEPES, free acid	Calbiochem	A grade
HEPES, Na-salt	Calbiochem	A grade
TRIS	Calbiochem	A grade

1.1.4 Radiochemikalien

Name	Hersteller	
PPO	Merck	
POPOP	Merck	
^{3}H-Pentalenolacton-Chlorhydrin	Amersham Buchler, Buckinghamshire, England	Tritium-Markierung n. Code TR8: 65 mCi

1.1.5 Nährmedien

Name	Hersteller
Yeast-extract	DIFCO, Detroit, USA
Bacto-Agar	DIFCO, Detroit, USA
Bacto-Peptone	DIFCO, Detroit, USA
Malt-extract	DIFCO, Detroit, USA

Alle übrigen beschriebenen C-Quellen, N-Quellen und Nähr-Salze wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

1.1.6 Modifizierungsreagentien

Name	Hersteller	Reinheitsgrad
5,5`-Dithiobis(2-Nitrobenzoic acid	Sigma, München	kristallin
p-Hydroxymercuri-benzoat	Sigma, München	kristallin
Pyridoxal-5-Phosphat	Sigma, München	98%
Methylglyoxal	Sigma, München	40%ige Lösung
2,4,6-Trinitrobenzol-sulfonsäure	Sigma, München	Grad II, Hydrat

1.1.7 Material für Säulen-Chromatographie

Name	Hersteller	Typ
Amberlite XAD-2	Serva, Heidelberg	Korngröße: 0,3...1.2 mm
Sephadex LH 20	Pharmacia, Uppsala Schweden	
Sephadex G-50	Pharmacia, Uppsala Schweden	fine
CM-Cellulose	BioRad, Richmond USA	Cellex-CM
Servachrom SI 100	Serva, Heidelberg	RP 18, 5 µm
Hyperchrom NC	Bischoff,Stuttgart	Nucleosil C 18, 5 µm
Hyperchrom präp.	Bischoff,Stuttgart	LiChrosorb RP 18, 10 µm

Sonstige Chemikalien wie Lösungsmittel, Säuren, Laugen und Salze wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Fluka, Neu-Ulm in analysenreiner Form bezogen.

1.1.8 Materialien für Isoelektrische Fokussierung und Gel-Elektrophorese

Name	Hersteller
System Servalytes Precotes	Serva, Heidelberg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Serva Violett 49	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Protein-Testmischung 9	Serva, Heidelberg

1.2 Organismus: Streptomyces arenae Tü 469 (DSM 40734)

Der den Antimetabolit Pentalenolacton produzierende Streptomycet wurde aus einer Bodenprobe isoliert, die vom Bougouriba-Fluß in Obervolta (Afrika) stammte.
Der Streptomyceten-Stamm erhielt am Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen die Bezeichnung Tü 469 und wurde nach den Vorschriften von Hütter, R. (30) bestimmt. Bis auf die Chromogenität beziehen sich die dort angegebenen Merkmale auf rein morphologische Kriterien.

Stamm-Bestimmung:
Der Streptomyceten-Stamm Tü 469 ist durch folgende artbestimmende Merkmale gekennzeichnet:

1. Die Sporen sind ellipsoid und ca. 1,2 x 0,8 µm groß; die Oberfläche ist mit steifen Stacheln besetzt, die bis zu 1 µm lang sind.
2. Das Luftmycel ist anfangs kreideweiß bis weißgrau, im ausgereiften Zustand aschgrau (cinereus).
3. Die Sporenketten sind monopodial verzweigt und in mehr oder weniger regelmäßigen lockeren Schrauben von 3 bis 6 Windungen angeordnet (Spira Typ b).
4. Beim Wachstum auf Eisen-Pepton-Agar bildet sich ein melaninhaltiges Pigment; der Stamm ist chromogen.
5. Das Substrat-Mycel hat eine hellgelbe bis dunkelbraune Farbe.

Aufgrund dieser Merkmale ist der Stamm Tü 469 in die Gruppe der grau sporulierenden (cinereus) Streptomyceten mit spiraliger Sporenkette einzuordnen. Die zusammengefaßten Bestimmungsmerkmale identifizieren ihn als zur Art Streptomyces arenae Abbott Lab. 1954 gehörend.

1.3 Geräte

Name	Typ	Hersteller
Fermenter	b 20	Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz

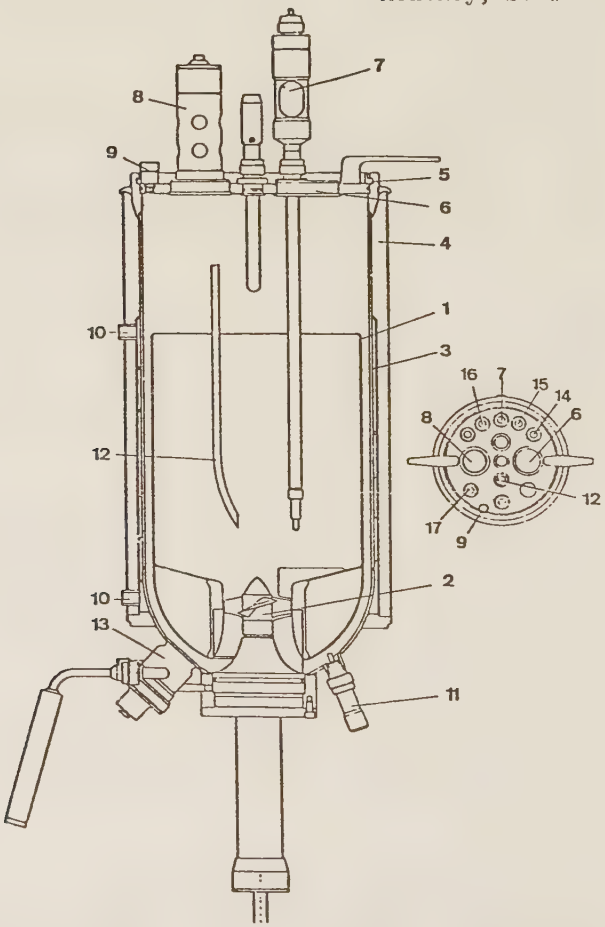


Abb. 1: Fermenter System "Intensor" der Giovanola Freres SA, Monthey, Schweiz nach Ref.(31): 1, Leitkörper; 2, Propeller-Pumpe; 3, Doppelmantel; 4, Isolationsmantel; 5, Spannring; 6, Schauglas; 7, pH-Elektrode; 8, Lampe; 9, Sicherungsschraube; 10, Anschlüsse f. Temperaturkreislauf; 11, Temperaturfühler; 12, Zuluftrohr u. Frischluft-Sterilfilter; 13, Probenahme-Ventil; 14, Thermometer; 15, Sauerstoff-Elektrode; 16, Rückflußkühler; 17, Membrananschluß f. Säure-o. Lauge-Zufuhr.

Weitere Geräte

Name	Typ	Hersteller
Autoklav	FO/3-Z1	Fedegari-Pavia, Italien
Durchlaufzentrifuge	KDD 605	Westphalia Separator, Oelde
IR-Spektrophotometer	FTS-IMX	BioRad, Richmond, USA
Doppelstrahl-Differenz-Zweiwellenlängen-Spektrophotometer	UV 300	Shimadzu, Kyoto, Japan
Protonen-Kernresonanz-Spektrometer	XL-100	Varian, Darmstadt
Inkubationsschüttler	LSR LAB-Shaker	B. Braun, Melsungen
pH-Meter	540	Knick, Berlin
Einstrahl-Photometer	55 E	Perkin-Elmer, Überlingen
Zweistrahl-Photometer	UV 210	Shimadzu, Kyoto, Japan
Potentiometer-Schreiber	Servogor S	Goerz, Wien, Österreich
Szintillationszähler	BF 5003	Berthold, Wildbad
Fraktionssammler	Ultrorac 7000	LKB, Stockholm, Schweden
Gel-Elektrophorese	Modell 220	BioRad, Richmond, USA
Fluoreszenz-Spektrometer	Modell 1000	Perkin-Elmer, Überlingen
Tischzentrifuge	5412	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	G 50 K	WKF, Darmstadt
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph (HPLC) mit 2-Kanal-Datensystem	SP 8000	Spectra Physics, Santa Clara, USA
UV-Detektor	Bt 3030	Biotronik, Frankfurt
Gefriertrockner	L05	WKF, Darmstadt
Aminosäure-Analysator	Liquimat III	Kontron, München

1.4 Allgemeine Methoden

1.4.1 Enzymatische Methoden

Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Enzymaktivitätsmessungen insbesondere die der Enzym-Spezifität von Pentalenolacton nach den bei Bergmeyer, H. (32) angegebenen Verfahren durchgeführt.

1.4.2 Protein-Bestimmung

Die Protein-Bestimmung erfolgte in einer modifizierten Form nach Lowry, H.O. et al. (33), wobei stets Protein-Standards (Rinderserum-Albumin) mitbestimmt wurden.

1.4.3 Radioaktivitätsmessungen

Von den wässrigen radioaktiven Proben wurden jeweils 10 µl Aliquots mit 5 ml Scintillator-Mix (Toluol/Triton-Scintillator) versetzt und im Liquid-Scintillation-Counter ausgezählt.

Toluol-Scintillator:

2,5 l Toluol p.a.
10 g PPO
0,25 g POPOP

Scintillator-Mix :

Mischung von
Toluol-Scintillator:Triton-X100=7:3

1.4.4 Darstellung von NAD-freier $GAPDH_{rm}$ (Apoenzym)

Um den schützenden und stabilisierenden Einfluß von gebundenem NAD auf reaktive Aminosäuren innerhalb der $GAPDH_{rm}$-Struktur (z.B. Lys 183, Cys 149; s.34) aufzuheben, war es für einige Experimente notwendig coenzym-freie $GAPDH_{rm}$ darzustellen.
Diese wurde nach einer sehr schonenden Methode von Nagradova, N.K. et al. (35) gereinigt, wobei als Kriterium für NAD-freie $GAPDH_{rm}$ das Absorptionsverhältnis von A_{280nm}: A_{260nm} herangezogen wurde, welches für das Holo-Enzym bei ca. 1 und für das Apo-Enzym bei ca. 2 liegt (36).

1.4.5 Aminosäure-Bestimmung nach saurer Peptid-Hydrolyse

Die nach Hochdruckflüssigkeitschromatographie isolierten ^{3}H-PL_c-modifizierten Peptide wurden 24 h bei 105°C unter Ölpumpen-Vakuum mittels 6 N HCl zu den entsprechenden Aminosäuren hydrolysiert und durch Lyophilisation getrocknet. Anschließend wurden die Aminosäuren in einem automatischen Aminosäure-Analysator identifiziert und quantitativ bestimmt.

1.4.6 Trockengewichtsbestimmung der gebildeten Biomasse

Zur Bestimmung der gebildeten Biomasse während der Fermentationen wie auch in den Schüttelkolben-Kulturen der Optimierungsexperimente wurden 20 ml Aliquots dieser Submers-Kulturen 1 h bei 135°C getrocknet und anschließend gewogen.

1.4.7 Elektrophoretische Methoden

1.4.7.1 Es wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Verfahren (Disc Page) angewendet, wobei das zu untersuchende Enzym $GAPDH_{rm}$ sowohl unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Disc Page) als auch unter nativen Bedingungen aufgetrennt wurde.

SDS-Disc Page:

Sammelgel (4,5%ig):

5 ml Lsg. B
1,5 ml Lsg. A
3,5 ml H_2O
100 µl 10%ige SDS-Lsg.
10 µl TEMED
10 mg Kaliumperoxidisulfat

Trenngel (15%ig) :

7,5 ml Lsg. A
2,5 ml Lsg. C
5,0 ml Lsg. D
150 µl 10%ige SDS-Lsg.
3 µl TEMED
8 mg Kaliumperoxidisulfat

Stamm-Lösungen:

Lsg. A: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Lsg. B: TRIS/HCl-Puffer 0,25 M, pH 6,8
Lsg. C: TRIS/HCl-Puffer 0,75 M, pH 8,8
Lsg. D: 50% Glycerin in Lsg. C

Elektrophorese-Puffer : 15 g Glycin + 3,1 g TRIS + 1 g SDS in 1 l Wasser, pH 8,3

aufgetragene Probenmenge : 0,3 nMole $GAPDH_{rm}$ in 20 µl Puffer

1.4.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen sowie anschl. Aktivitätsbestimmung über Fluoreszenzmessung

Sammelgel (4%ig) :

2,5 ml H_2O
1,3 ml Lsg. B
2,5 ml Lsg. E
1,2 ml Glycerin
2,5 ml Kaliumperoxidisulfat-Lösung (0,14%ig)

Trenngel (5%ig) :

1,5 ml Lsg. C
3,0 ml Lsg. A
1,5 ml H_2O
6,0 ml Kaliumperoxidisulfat-Lösung (0,14%ig)

Stamm-Lösungen :

Lsg. A: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Lsg. B: TRIS/HCl-Puffer, 0,25 M, pH 6,8
Lsg. C: TRIS/HCl-Puffer, 0,75 M, pH 8,8
Lsg. E: 10% Acrylamid, 2,5% Bisacrylamid

Elektrophorese-Puffer : 30 g Glycin + 6,2 g TRIS in 1 l Wasser, pH 8,3

aufgetragene Probenmenmenge : 0,3 nMole $GAPDH_{rm}$ in 20 µl Puffer

Aktivitätsbestimmung:
Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5 min bei 4°C gekühlt und anschl. mittels eines Gelschneiders in 2 mm breite Fraktionen geteilt. Die einzelnen Gel-Segmente wurden in folgenden Test-Mix überführt:

Test-Mix:

1000 µl 0,05 M TRIS (5 mM ß-ME, 5 mM EDTA) pH 8,
100 µl 0,05 M NAD
50 µl 0,20 M di-Na-Hydrogenarsenat x 7 H_2O
200 µl 0,005M D-GAP

Inkubationsbedingungen: 45 min bei 25°C

Anschließend wurde die relative Fluoreszenz-Intensität des gebildeten NADH im Fluoreszenz-Spektrometer gemessen (Anregung: λ:340 nm, Messung: λ:470 nm).
Ebenfalls wurde am gleichen Gel eine Protein-Anfärbung nach Weber/Osborn (37) durchgeführt.

Protein-Anfärbung nach Weber/Osborn (37):

Anfärbung: 1,25 g Coomassie Blue G 250
46 ml Essigsäure (100%ig)
227 ml Methanol p.a.
227 ml Wasser

Färbedauer: 30...60 min

Entfärbung: 300 ml Essigsäure (100%ig)
300 ml Methanol p.a.
3400 ml Wasser

1.4.7.3 Isoelektrische Fokussierung

Um eventuelle Veränderungen elektrophoretischer Eigenschaften von nativer zu PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ zu erkennen, wurde eine isoelektrische Fokussierung nach einem System der Firma Serva, Heidelberg mit sogen. Servalyt Precotes (38) durchgeführt.

1.4.8 Proteolyse von PL_c-modifizierter und nativer $GAPDH_{rm}$

1.4.8.1 Proteolyse mittels DCC-Trypsin (39)

30 mg (0,2 µMole) $GAPDH_{rm}$ wurden in 150 µl Ammonium=hydrogencarbonat-Puffer + 0,1 M ß-ME pH 8,5 aufgenommen. Die Enzym-Lösung wurde anschl. mit 1,8 µMole (1,68 mCi) ^3H-PL_c 60 min bei 25°C inkubiert, wobei die auftretende Hemmung der katalytischen Aktivität enzymatisch nach 1.5.1.1.4 überprüft wurde.
Die entstandene ^3H-PL_c-markierte $GAPDH_{rm}$ sowie auch unbehandelte $GAPDH_{rm}$ gleicher Konzentration konnten anschließend mit 65 µl DCC-Trypsin-Lösung (1o mg DCC-Trypsin/1 ml 1 mM HCl; E:S=1:50) über 24 h bei 3o°C hydrolysiert werden ($Volumen_{total}$: 330 µl). 25 µl (15 nMole $GAPDH_{rm}$) des Hydrolysats wurden jeweils durch das analytische HPLC-System fraktioniert.

Proteolyse mittels Clostripain (40)

Analog den Proteolyse-Experimenten mittels DCC-Trypsin wurden auch Versuche mit der arginin-spezifischen Protease Clostripain bei nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ durchgeführt, wobei die Proteolyse durch die in 1.4.7.1 beschriebene SDS-Disc-Page-Gelelektrophorese kontrolliert wurde.

1.5 Spezielle Methoden

1.5.1.1 Experimente zur Irreversibilität der Bindung von Pentalenolacton an seinen Wirkort GAPDH

Die schon von Hartmann, S. (29) postulierte irreversibele Bindung von Pentalenolacton an GAPDH wurde durch drei weitere Experimente gestützt.

1.5.1.1.1 Denaturierung mit anschließender Renaturierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$

Unter Test-Bedingungen, wie sie schon für LDH beschrieben sind (41), wurden Versuche mit nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ durchgeführt.
Hierzu wurden 1 mg $GAPDH_{rm}$ in 800 µl 0,025 M TRIS-Puffer + 0,075 mM NAD + 0,125 M ß-ME pH 8,5 aufgenommen, in gleiche Volumina halbiert und zum einen mit 10 µl 10 mM PL_c-Lösung sowie zum anderen mit 10 µl 50%igem Methanol versetzt und 45 min bei 25°C inkubiert. Beide Ansätze wurden über den Test nach 1.5.1.1.4 zur Bestimmung des Inhibitionsgrades kontrolliert.

Danach wurde zu beiden Ansätzen 190 mg Harnstoff (8 M) zugesetzt und wiederum 15 min inkubiert. Die Ansätze wurden auf 20 ml Gesamt-Volumen aufgefüllt und 48 h bei 2°C unter mehrmaligem Puffer-Austausch dialysiert. Hiernach wurde wiederum der Test nach 1.5.1.1.4 durchgeführt.
Ebenfalls wurde versucht eventuell abgespaltenes PL_c nach Denaturierung mittels 8 M Harnstoff sowie nach anschließender Trichloressigsäure-Fällung im Inkubationsansatz über den quantitativen Test auf PL_c nach 1.5.1.1.4 nachzuweisen.

1.5.1.1.2 Gleichgewichtsdialyse

Stamm-Lösungen:

A. 0,66 mM PL_c-Lsg. in Puffer C
B. 3,40 µM $GAPDH_{rm}$-Lsg. in Puffer C
C. 0,05 M Na-Pyrophosphat-Puffer pH 8,5 (5 mM EDTA, 5 mM ß-ME)

Dialyse-Bedingungen:

Dauer : 4 h
Temperatur: 22°C

Probe-Volumen:

2 µl Aliquots aus beiden Kammern wurden in den quantitativen Test auf PL_c nach 1.5.1.1.4 eingesetzt und die prozentuale Rest-Aktivität bestimmt.

1.5.1.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Ebenfalls unter dem Gesichtspunkt der irreversibelen Bindung von PL_c an $GAPDH_{rm}$ wurde eine Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen und anschließender Aktivitätsbestimmung nach Methode 1.4.7.2 durchgeführt.

1.5.1.1.4 Quantitativer Test auf Pentalenolacton-Chlorhydrin

Aufgrund der Irreversibilität des Enzyms $GAPDH_{rm}$ gegen den Antimetabolit Pentalenolacton-Chlorhydrin ist eine quantitative und schnelle Bestimmung in den Schüttelkolben-Kulturen der Optimierungsexperimente sowie während der Fermentationen und anschließender Isolierung möglich.

Ebenfalls diente der wie folgt beschriebene Test zur Darstellung und Kontrolle von PL_c-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparaten, welche in die verschiedenen Experimente eingesetzt wurden.
Hierbei wurde die enzymatische Rest-Aktivität der $GAPDH_{rm}$ unter Einfluß von PL_c in einem modifizierten Test-System nach Furfine, C.S. et al. (42) gemessen.

D-GAP $\xrightarrow{\text{D-GAPDH}}$ 1,3 Diphosphoglycerat	
Lösungen:	Volumen:
0,05 M Na-Pyrophosphat-Puffer pH8,5 (5 mM 2-ME, 5 mM EDTA)	1630 ul-x
0,05 M NAD^+	100 ul
0,20 M di-Na-Hydrogenarsenat x $7H_2O$	50 ul
80 U/mg D-GAPDH, 1:400 verdünnen;	20 ul
0,01 M PL_c-Lösung, 1:20000 verdünnen;	5-50 ul:x
mischen, 60 min bei 25°C inkubieren, starten mit	
0,01 M D-GAP	200 ul
Messung bei λ: 334 nm	

Tab. 1: Test-Bedingungen für die quantitative Bestimmung von Pentalenolacton-Chlorhydrin (PL_c).

Definierte Probevolumina einer 10 mM PL_c-Lösung (3,12 mg PL_c/1 ml 50%iges Methanol; 1:20000 verdünnt) wurden hierbei dem beschriebenen Testansatz zugegeben, 60 min bei 25°C inkubiert, und nach Zugabe von D-GAP als Substrat wurde das gebildete NADH über die Extinktion bei 334 nm gemessen. Anschließende Quotienten-Bildung (% $GAPDH_{rm}$-Hemmung) der Steigung eines Kontroll-Ansatzes ohne PL_c mit den Steigungen der aufgezeichneten NADH-Bildungskurven bei Anwesenheit unterschiedlicher PL_c-Mengen ergeben eine Eich-Kurve, welche Grundlage für alle folgenden Experimente darstellte.

Hydrolyse von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Diäthylacetal

100 mg D-GAP-Diäthylacetal (Dicylohexylammonium-Salz) werden in 18 ml destilliertem Wasser gelöst, mit 0,5 ml 2 M Schwefelsäure versetzt und 7,5 min bei 80°C im Wasserbad inkubiert.
Danach wird die Lösung im Eisbad auf 20°C abgekühlt und mit 2 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 5,0 eingestellt.
Die nach dieser Methode hergestellte D-GAP- Lösung hat eine Konzentration von ca. 10 mM und bleibt etwa 10 Tage bei -20°C stabil.

1.5.1.1.5 Bestimmung der Stöchiometrie der Reaktion von Pentalenolacton-Chlorhydrin mit $GAPDH_{rm}$

Aufgrund der nachgewiesenen Irreversibilität der Bindung von PL_c an $GAPDH_{rm}$ konnte eine Bestimmung der molararen Verhältnisse zwischen Inhibitor und Enzym unter den Bedingungen nach 1.5.1.1.4 vorgenommen werden.
In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Test-System dahingehend geändert, daß 200 µl 0,35 µM $GAPDH_{rm}$-Lösung mit entsprechenden Aliquots einer 5 µM PL_c-Lösung 45 min bei 25°C inkubiert und anschließend 24 h gegen 0,05 M Na-Pyrophosphat-Puffer (5 mM EDTA, 5 mM ß-ME) pH 8,5 dialysiert wurden.
Hiernach erfolgte wiederum die Bestimmung der enzymatischen Rest-Aktivität mit 20 µl dieser Inkubationsansätze nach Methode 1.5.1.1.4.

1.5.1.2 Modifizierungsexperimente an nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$

1.5.1.2.1 Bestimmung von SH-Gruppen nach Ellmann (43)

Die Bestimmung der Sh-Gruppen von unbehandelter und Pl_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ erfolgte mittels Ellmann's Reagens (DTNB) unter den Bedingungen wie sie bei Janatova, J. et al. (44) beschrieben sind.
Hierbei wurden die Bedingungen so gewählt, daß neben der Anzahl sämtlicher zugänglicher SH-Gruppen im denaturierten Enzym auch die reaktiven SH-Gruppen nach Methode 1.4.4 im nativen Zustand bestimmbar waren.

1.5.1.2.2 Bestimmung von SH-Gruppen mittels p-HMB

Nach einer Methode wie sie bei Benesch, R. et al. (45) beschrieben ist, wurden wiederum sowohl die Anzahl sämtlicher zugänglicher SH-Gruppen im denaturierten Enzym-Zustand wie auch die reaktiven SH-Gruppen im nativen Enzym-Zustand bestimmt.

1.5.1.2.3 Bestimmung sämtlicher freien ε-Amino-Gruppen mittels TNBS

Nach einer bei Habeeb, A. et al. (46) beschriebenen Methode wurden sämtliche freien ε-Amino-Gruppen in unbehandelter wie auch PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ bestimmt.

1.5.1.2.4 Bestimmung der reaktiven ε-Amino-Gruppen von Lysin mittels PALP

Nach Experimenten, welche Ronchi, S. et al. (47) und Forcina, B. et al. (48) an $GAPDH_{rm}$ durchgeführt haben wurden analoge Experimente bei PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ durchgeführt.

1.5.1.2.5 Modifizierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ mittels Methylglyoxal

Aufgrund von Modifizierungsexperimenten mittels Methylglyoxal, Phenylglyoxal und 2,3-Butandion, welche die Beteiligung von reaktiven Arginin-Resten bei der Enzym-Katalyse speziell der Substrat-Bindung innerhalb der GAPDH untersuchten (35, 49, 50, 51), wurde auch PL_c-modifizierte $GAPDH_{rm}$ diesen Bedingungen unterworfen, wobei die Methode nach Leocini, G. et al. (52) angewandt wurde.

1.5.1.3 Experimente zum Einfluß der Cosubstrate NAD und ATP auf die Pentalenolacton-Hemmwirkung

1.5.1.3.1 Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem NAD und PL_c

Um eine eventuelle Korrelation zwischen NAD-Beladung und Inhibitionsgrad durch PL_c bei $GAPDH_{rm}$ zu untersuchen wurden 28 µMole $GAPDH_{rm}$ (Apoenzym) mit unterschiedlichen Konzentrationen von NAD (0,5...4 Mole NAD/1 Mol $GAPDH_{rm}$) behandelt und anschließend 24 h bei 2°C gegen 0,05 M Na-Pyrophosphat-Puffer + 1 mM EDTA pH 8,5 dialysiert, wobei die NAD-Beladung zum einen über den spektralen Koeffizienten A_{280nm}: A_{260nm} und zum anderen enzymatisch nach folgendem Pipettier-Schema überprüft wurde:

0,05 M Na-Pyrophosphat-Puffer +1 mM EDTA, pH 8,5	1500 µl
14,12 µM $GAPDH_{rm}$-Lösung	1000 µl
0,50 M Cystein-Lösung	30 µl
0,10 M Arsenat-Lösung	150 µl
60 min bei 2°C inkubieren; anschl. starten	
0,10 M D,L-GAP-Lösung	300 µl
Messung bei λ: 340 nm	

Die NAD-behandelten Proben wurden anschließend mit 5 µl PL_c-Lösung (100 mM), welches einem 10fachen molaren Überschuß bezogen auf die $GAPDH_{rm}$-Konzentration entspricht, inkubiert und wiederum 48 h bei 2°C gegen Na-Pyrophosphat-Puffer dialysiert.
Anschließend wurde der Grad der Enzym-Hemmung nach Methode 1.5.1.1.4 bestimmt.

1.5.1.3.2 Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem ATP und Pentalenolacton

Versuche, welche den Einfluß von ATP auf die Konformation (53) und somit auf die metabolische Kontrolle von GAPDH untersuchten (54), führten zu dem Experiment, diesen Einfluß unter gleichen Bedingungen auch in Zusammenhang mit verschiedenen Pentalenolacton-Derivaten durchzuführen (55). Hierzu wurden PL-modifizierte $GAPDH_{rm}$-Präparate mit nicht vollständiger Hemmung bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen inaktiviert (2h; 20°C), wobei die auftretenden Inhibitionsgrade enzymatisch nach folgendem Pipettier-Schema kontrolliert wurden:

Test-Mix:	1780 µl
	100 mM Glycin-Puffer pH 8,0
	10 mM Arsenat-Lösung
	1 mM NAD-Lösung
	9 mM Cystein-Lösung
Probe :	20 µl; anschl. starten mit
	200 µl 10 mM D-GAP-Lösung
Messung bei λ:	334 nm

1.5.1.4 Isolierung ^{3}H-PL_c-markierter tryptischer Peptide mittels analytischer HPLC

Nach einem modifizierten System nach Rasched, J. et al. (56) wurden die nach 24stündiger tryptischer Hydrolyse nach Methode 1.4.8.1 entstandenen Peptide über UV-Detektion bei 220 nm sowie Tritium-Auszählung mittels LSC isoliert und nach Rechromatographie durch Aminosäure-Analyse nach Methode 1.4.5 charakterisiert:

Säulen-Typ	: Hyperchrome NC
Länge	: 250 mm
I.D.	: 4,6 mm
Füll-Material	: Macherey&Nagel Nucleosil C18
Partikelgröße	: 5 um
Gradient	: linear 25 min von 92,5% Puffer A...60% Puffer B Puffer A: 80 mM Triäthylammoniumphosphat-Puffer pH 2,7 Puffer B: 60% Acetonitril/40% Puffer A
chart speed	: 0,5 cm/min
flow rate	: 1,1 ml/min
flow mode	: QG
attenuation	: 320 mV
Temperatur	: 20°C
Detektion	: 220 nm
aufgetragene Menge	: 15 nMole ^{3}H-PL_c-$GAPDH_{rm}$

1.5.2 Produktion und Isolierung von Pentalenolactone

1.5.2.1 Nährmedien u. Kulturbedingungen des Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae Tü 469

1.5.2.1.1 Schrägagar-Kultur:

Der verwendete Stamm wurde in Form von lyophilisierten Sporen aus dem Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen bezogen.
Diese Sporen wurden in vorher autoklavierten Wickerham-Optimalmedium angezogen:

Nährstoffe:	Einwaage: bez. auf 1 Liter
Yeast-Extract	3 g
Malt -Extract	3 g
Bacto-Peptone	5 g
D-Glucose	30 g

Aus dieser Submers-Kultur wurden mittels einer Impföse Reagenzgläser zu je 10 ml autoklavierten synthetischem Minimal-Medium nach Zygmunt, W.A. (57) beimpft:

Nährstoffe:	Einwaage: bez. auf 1 Liter	
$(NH_4)_2HPO_4$	2 g	
NaCl	1 g	
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	2 g	
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1 g	
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,4 g	Sörensen-Puffer pH 6,6
$FeSO_4 \times 7H_2O$	20 mg	
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	10 mg	
L-Asparagin	3 g	
D-Mannit	40 g	
Bacto-Agar	15 g	

Daraufhin wurde bei 30°C inkubiert bis gutes Wachstum erkennbar war. Die Schrägagar-Kulturen wurden danach bei +4°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt und bildeten den Ausgang für die Schüttelkolben-Kulturen und Fermentationen.

1.5.2.1.2 Submers-Vorkulturen

Vorkultur I:

11 Schikanekolben wurden mit je 200 ml synthetischem Minimal-Medium nach 1.5.2.1.1 beschickt und nach dem Autoklavieren und Abkühlen steril mittels einer Impföse aus einer Schrägagar-Kultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte 100 h bei 30°C auf einem rotierenden Inkubations=schüttler bei 80 Upm.

Vorkultur II: Impfkultur für Fermentationen

5l Schikanekolben wurden mit 1l synthetischem Minimal-Medium nach 1.5.2.1.1 beschickt und nach dem Autoklavieren und Abkühlen steril mittels einer 20 ml Meßpipette aus der Vorkultur I angeimpft. 50 h wurde bei 30°C auf dem rotierenden Inkubationsschüttler mit 80 Upm inkubiert.

Alle Medien wurden im Autoklav 20 min bei 120°C sterilisiert.

1.5.2.1.3 Submers-Kulturen für die Nährmedium-Optimierung

Ausgangspunkt für alle Versuche der Nährmedium-Optimierung waren 180 ml synthetisches Minimal-Medium nach 1.5.2.1.1 in 1l-Schikanekolben, welche mit 20 ml einer 100stündigen Vorkultur I nach 1.5.2.1.2 angeimpft wurden. Alle 10 h wurden steril Proben (0,5 ml) entnommen und quantitativ auf Pentalenolacton nach Methode 1.5.1.1.4 getestet. Bei Erreichen konstanter PL-Konzentrationen, welche einhergehen mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase, wurde der Versuch beendet und die gebildete Biomasse als Trockengewicht nach Methode 1.4.6 bestimmt.
Sämtliche Submers-Kulturen wurden bei einer Temperatur von 29°C über einen Zeitraum bis zu 7 Tagen inkubiert und getestet.

1.5.2.2 Fermentation von Streptomyces arenae Tü 469

Nach dem Animpfen des Fermenters (s. Abb.:1; 181) mit 2 x 1l Vorkultur II (s. 1.5.2.1.2) wurden im Verlauf der Fermentation alle 5h über das separat sterilisierbare Probeentnahmeventil Proben entnommen, deren Volumina durch vorwählbare Öffnungszeiten definiert einstellbar waren. Diese 20 ml Proben wurden durch Abfiltrieren über eine Nutsche dahingehend aufgearbeitet, daß eine Trennung in Kultur-Filtrat zur Bestimmung der Produkt-Bildung (Pentalenolactone) sowie des Substrat-Verbrauchs (D-Mannit) und in gebildeter Biomasse zur Trockengewichtsbestimmung vorgenommen werden konnte.
Weiterhin wurden alle physikochemischen Parameter (pH-Wert, Temperatur, pO_2-Wert, Drehzahl des Umwurfsystems) über einen Schreiber während der gesamten Fermentation kontinuierlich überwacht.

1.5.2.2.1 Enzymatische Bestimmung von D-Mannit

1.5.2.2.2 Isolierung von Mannit-Dehydrogenase aus Streptomyces arenae

Nach einer Methode von Horikoshi, K. et al. (58) wurde folgende Vorschrift zur Isolierung von Mannit-Dehydrogenase entwickelt:
Alle folgenden Isolierungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.
15 g (Feuchtgewicht) Streptomyces arenae wurden mit 30 g Aluminiumoxid-Pulver (Alcoa A-305) in einem vorgekühlten Mörser aufgeschlossen. Die entstandene Paste, mit 100 ml TRIS-Puffer (0,05 M, pH 7,0) extrahiert, wurde bei 5000 Upm 10 min zentrifugiert und danach vorsichtig abdekantiert (Niederschlag wurde verworfen!).
Der überstand wurde mit pulverisiertem Ammonsulfat auf 20%ige Sättigung eingestellt und nach 30 min Rühren 20 min bei 7000 g zentrifugiert.
Der abdekantierte Überstand wurde nochmals mit Ammonsulfat auf 50%ige Sättigung gebracht und nach 30 min Rühren wiederum 20 min bei 7000 g zentrifugiert.
Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Niederschlag in 10 ml TRIS-Puffer aufgenommen und zum späteren Einsatz in den enzymatischen Test bei -20°C aufbewahrt (Haltbarkeit: 2...3 Wochen).

1.5.2.2.3 Enzymatischer Test zur Konzentrationsbestimmung von D-Mannit

Um ein Maß über den Mannit-Verbrauch im Verlauf der Fermentation zu erhalten, wurde die Vorschrift einer enzymatischen Mannit-Bestimmung nach Bergmeyer, H. (32) angwendet.

1.5.2.3 Isolierung von Pentalenolactone

Durch Anwendung des quantitativen Tests nach 1.5.1.1.4 ergab sich die Möglichkeit produktschädigende und somit verlustreiche Aufarbeitungsschritte zu ermitteln und effektivere Reinigungsmethoden zu erproben, um letztendlich eine optimale Isolierung des Sekundär-Metabolits zu erzielen, welche in folgendem Fließschema (s.Abb.:2) zusammengefaßt sind.
Die folgenden Arbeitsgänge wurden, falls nicht anders erwähnt, bei 4°C durchgeführt.

1.5.2.3.1 Adsorption an Amberlite XAD-2

Nach dem Ansäuern des Kultur-Mediums im Fermenter auf pH 2,5...3,0 mittels H_3PO_4, konz., erfolgte über eine Durchlaufzentrifuge die Trennung in Kultur-Filtrat und Biomasse.
Das aufgefangene Kultur-Filtrat wurde danach kontinuierlich über eine Amberlite XAD-2-Säule geführt, wobei lipophile Bestandteile haften bleiben und wasserlösliche Komponenten im Durchlauf zu finden sind. Der quantitative Test auf Pentalenolactone in einer Probe des Durchlaufs verlief erwartungsgemäß negativ.
Nach dem vollständigen Aufbringen des Kultur-Filtrats auf die Säule und anschließendem Waschen mit destilliertem Wasser, wurde mit Methanol p.a. eluiert, wobei es von Vorteil war, die Vorlage erst zu wechseln, wenn die sichtbare Wasserfront am unteren Ende der Säule angelangt war. Dieses gelbbraungefärbte Eluat wurde am Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockne eingeengt.

Dimensionen der Säule:

Füll-Material: Amberlite XAD-2
Durchmesser : 7 cm
Füll-Höhe : 50 cm
Volumen : 2500 cm^3
Durchflußrate: 10 l/h

1.5.2.3.2 Äther-Extraktion der lipophilen Anteile

Das braune, harzige Material aus der Amberlite XAD-2 Reinigungsstufe wurde mit 500 ml Äther, p.a. versetzt und 24 h unter Rühren extrahiert.
Das hierbei anfallende unlösliche Pulver wurde abfiltriert und nach einem GAPDH-Hemmtest, welcher negativ verlief, verworfen.
Die klare Äther-Phase wurde nach dem Trocknen über Natriumsulfat, wasserfrei am Rotationsverdampfer bei 30°C bis zur Trockne einrotiert.
Das so erhaltene Rohprodukt war ein hellgelbes, glasiges Material.

1.5.2.3.3 Gelfiltration an Sephadex LH 20

Das hellgelbe Pulver der Äther-Extraktion wurde in Methanol p.a. aufgenommen und auf die mit Methanol äquilibrierte Säule aufgebracht.
Anschließend erfolgte Elution mit Methanol p.a. unter Zuhilfenahme eines Fraktionssammlers.

Dimensionen der Säule:

Füll-Material: Sephadex LH 20
Durchmesser : 2 cm
Füll-Höhe : 95 cm
Volumen : 240 cm^3
Durchflußrate: 30 ml/h
Frakt.-Volumen: 10 ml

Die aufgefangenen Fraktionen wurden einem quantitativen Test auf Pentalenolacton nach 1.5.1.1.4 unterworfen und entsprechend vereinigt. Die vereinigten GAPDH-hemmaktiven Fraktionen wurden ebenfalls am Rotationsverdampfer bis zur Trockne bei 30°C eingeengt.
Zum Abschluß wurde der Rückstand 24 h unter Hochvakuum im Exsikkator von letzten Lösungsmittelresten befreit.
Zur Erreichung eines hohen Reinheitsgrades erwies es sich als vorteilhaft, die Chromatographie an Sephadex LH 20 mit dem Rohprodukt zu wiederholen.

1.5.2.3.4 Präparative HPLC (reverse phase) v. Pentalenolacton

1 g des Rohproduktes wurden in 4 ml Eluent aufgenommen und zu je 0,5 ml in folgendem HPLC-System chromatographiert und fraktioniert:

Säulen-Typ	: Hyperchrome präp.
Länge	: 250 mm
I.D.	: 16 mm
Füll-Material	: Merck LiChrosorb RP 18
Partikelgröße	: 10 µm
Eluent	: Methanol:Wasser= 1:1, pH 2,7 eingestellt mit 10 ml H_3PO_4,konz.+ 10 ml 10 M KOH
chart speed	: 0,25 cm/min
flow rate	: 5,5 ml/min
flow mode	: QI (isokratisch)
attenuation	: 40 mV
Temperatur	: 25°C
Detektion	: 254 nm

Die einzelnen Fraktionen wurden zu je 10 µl in den Test nach 1.5.1.1.4 eingesetzt und die $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität bestimmt.

Die GAPDH-hemmaktiven Fraktionen wurden mit Chloroform extrahiert, getrocknet und zur Trockne einrotiert.

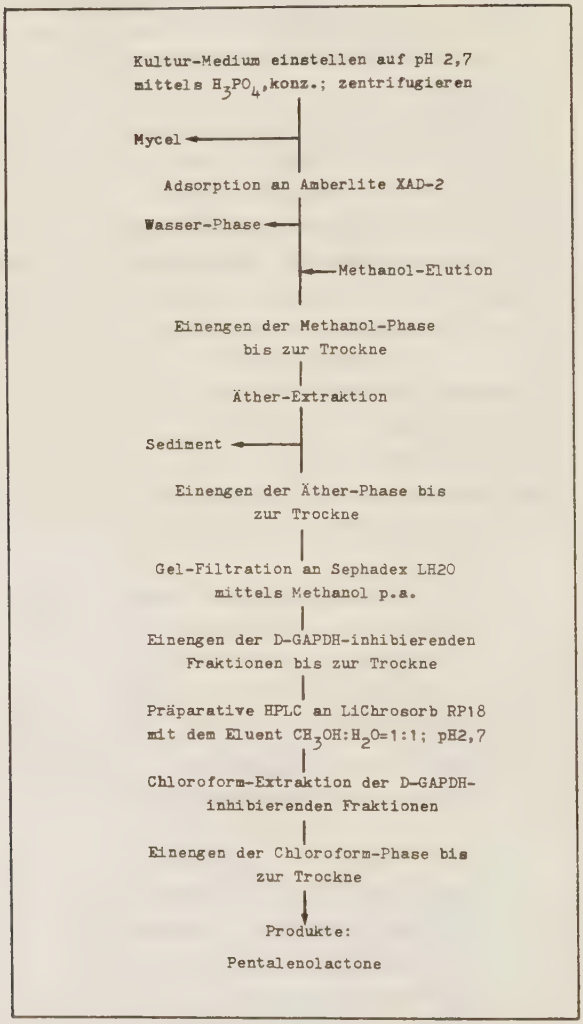


Abb. 2: Aufarbeitungsschema zur Isolierung von Pentalenolacton aus dem Kultur-Filtrat der Fermentation.

1.5.3 Chemische Analysen

1.5.3.1 Die isolierten Produkte aus dem Kulturfiltrat der Fermentationen sowie die durch chemische Synthese dargestellten Verbindungen (s. 1.5.4) wurden mittels

Protonen-Kernresonanz-Spektroskopie ^{1}H-NMR,
Infrarot-Spektroskopie IR ,
Ultraviolett-Spektroskopie UV ,
Dünnschicht-Chromatographie DC ,
Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC ,
sowie Elementar-Analyse

identifiziert und charakterisiert.

1.5.3.2 Analytische HPLC (reverse phase) der Pentalenolactone

30 µl von 10 mM Stamm-Lösungen der Pentalenolacton-Derivate wurden in folgendem HPLC-System chromatographiert:

Säulen-Typ	: Servachrom SI 100
Länge	: 250 mm
I.D.	: 4,6 mm
Füll-Material	: RP 18
Partikelgröße	: 5 µm
Eluent	: Methanol:Wasser= 1:1, pH 2,7 eingestellt mit 10 ml H_3PO_4,konz.+ 10 ml 10 M KOH
chart speed	: 0,25 cm/min
flow rate	: 1,0 ml/min
flow mode	: QI (isokratisch)
attenuation	: 80 mV
Temperatur	: 25°C
Detektion	: 254 nm

1.5.4 Darstellung von Pentalenolacton-Derivate und strukturell verwandten Verbindungen

1.5.4.1 Darstellung von Pentalenen

Die chemische Synthese von Pentalenen erfolgte nach einer Vorschrift sowie einer persönlichen Mitteilung von Prof. H. Shirahama et al. (59) und wurde von Dipl.Biochem. K.-H. Maurer durchgeführt.

1.5.4.2 Isolierung von Isocomensäure

Die Isolierung des Pflanzen-Sesquiterpen-Lactons Isocomensäure erfolgte durch Prof. F. Bohlmann et al. (60), dem ich an dieser Stelle für die Bereitstellung dieser Substanz besonders danken möchte.

1.5.4.3 Darstellung von D,L-Isoiridomyrmecin

Die chemische Synthese des von Ameisen synthetisierten Abwehrstoffes (61) D,L-Isoiridomyrmecin, welcher von Cavill et al. (62) entdeckt wurde, erfolgte nach der Vorschrift der Total-Synthese von Robinson et al. (63). Neben seiner insektiziden Wirksamkeit wird dieser Verbindung antibiotische Eigenschaften gegenüber Typhus-, Paratyphus-, Cholera- und Tuberkel-Erregern zugeschrieben und war deshalb in Hinblick auf eine eventuelle GAPDH-Inhibition interessant.

1.5.4.4 Darstellung von Methylestern

Nach einer Methode von Fales, H.M. et al. (64) wurden ausgehend von Pentalensäure und Pentalenolacton-Chlorhydrin die entsprechenden Methylester durch Umsetzung mit Diazomethan synthetisiert.

1.5.4.5 Darstellung von 7,8 Dimethyl-5-(α-Hydroxy-ß-Chlorethyl)-6-Bicyclo-[3.3.0]-Octadien-(2.6)-3-Carbonsäure

Ausgehend von Pentalenolacton-Chlorhydrin wurde unter alkalischen Bedingungen mittels wässriger $Ba(OH)_2$-Lösung die Aufspaltung des Lacton-Ringes herbeigeführt (65, 10), wobei obige Verbindung entstand.

1.5.4.6 Bestimmung der relativen $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität

Durch den quantitativen Test nach Methode 1.5.1.1.4 wurden von allen isolierten Pentalenolacton-Derivaten sowie den strukturell verwandten Verbindungen ausgehend von 10 mM Stamm-Lösungen die relative $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität bestimmt.
Unter relativer Hemmaktivität versteht man das Verhältnis der Konzentration des stöchiometrisch reagierenden Pentalenolacton-Chlorhydrin-Derivates ($ID_{50,PLc}$) zu der Konzentration der strukturell verwandten Verbindung ($ID_{50,X}$), die nach 60 min Inkubation eine 50%ige Hemmung der $GAPDH_{rm}$ hervorruft:

$$\text{relative Hemmaktivität} = ID_{50,PLc} : ID_{50,X} \cdot$$

2.0 Ergebnisse

2.1 Experimente zur Irreversibilität der Bindung von Pentalenolacton an seinen Wirkort GAPDH

In dieser Versuchsreihe wurde die von Hartmann, S. (29) durch kinetische Daten postulierte irreversible Bindung von Pentalenolacton an GAPDH dahingehend untersucht, ob eine Abspaltung von PL_c aus seinem Bindungsort $GAPDH_{rm}$ unter verschiedenen physiko-chemischen Bedingungen möglich ist.

2.1.1 Denaturierung mit anschl. Renaturierung von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$

Durch Denaturierung in 8 M Harnstoff sowie anschließender Renaturierung nach Dialyse kann keine Reaktivierung der vollständig gehemmten PL_c-modifizierten $GAPDH_{rm}$ erreicht werden, die auf eine Abspaltung des Inhibitors PL_c beim Denaturierungsvorgang und anschließender Dialyse hingewiesen hätte.
Dagegen konnten bei der Kontrolle mit nativer $GAPDH_{rm}$ ein Renaturierungskoeffizient von RQ= 22,5% unter der gegebenen Mercaptoäthanol-Konzentration erreicht werden (s. Tab.: 2).
Ebenfalls war kein freigesetztes PL_c nach der Denaturierung in 8 M Harnstoff-Lösung und einer Protein-Fällung mittels 25%iger Trichloressigsäure in den Inkubationsansätzen durch einen GAPDH-Hemmtest nach Methode 1.5.1.1.4 nachweisbar.

Test-Ansatz	spez. Aktivität vor der Dialyse	spez. Aktivität nach 24h Dialyse	RQ
$GAPDH_{rm}$	61,3 U/mg	13,84 U/mg	22,5%
PL_c-$GAPDH_{rm}$	0	0	0

Tab. 2: Renaturierung (RQ) von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ nach Denaturierung in 8M Harnstoff.

2.1.2 Gleichgewichtsdialyse

Bei der durchgeführten Gleichgewichtsdialyse konnte ebenfalls keine reversible Gleichgewichtseinstellung zwischen Inhibitor und Enzym festgestellt werden. Die eingesetzte $GAPDH_{rm}$-Menge war in allen Proben durch einen konstanten Anteil an eingesetzter PL_c-Menge vollständig gehemmt, wobei die überschüssige PL_c-Menge eine Gleichverteilung in beiden Kammern ergab, die anhand der nach Methode 1.5.1.1.4 bestimmten GAPDH-Restaktivitäten zu erkennen ist (s. Tab. 3).
Auch in dem hier durchgeführten Versuch kann von einer irreversiblen Bindung von PL_c an $GAPDH_{rm}$ ausgegangen werden.
Bei Extrapolation der eingesetzten PL_c-Mengen (µg) in Abhängigkeit von den gemessenen $GAPDH_{rm}$-Restaktivitäten (%) ergab dieser Versuch einen Hinweis auf die Stöchiometrie der Inhibitor/Enzym-Reaktion von 4 Mole PL_c pro 1 Mol $GAPDH_{rm}$ (s. Abb. 3).

Probe	eingesetzt in Kammer A PL_c	Kammer B $GAPDH_{rm}$	gemessen über % R.A. in Kammer A PL_c,frei	Kammer B PL_c,frei	Kammer B $GAPDH_{rm}$
1	13,2 nMol	3,2 nMol	95,5%	0	0
2	16,5 nMol	3,2 nMol	75,5%	86,8%	0
3	19,9 nMol	3,2 nMol	72,5%	72,5%	0
4	23,2 nMol	3,2 nMol	62,5%	62,5%	0
5	26,5 nMol	3,2 nMol	51,5%	51,5%	0
6	29,8 nMol	3,2 nMol	47,5%	47,5%	0
7	33,0 nMol	3,2 nMol	32,0%	32,0%	0

Tab. 3: Meßergebnisse der Gleichgewichtsdialyse nach Methode 1.5.1.1.4.

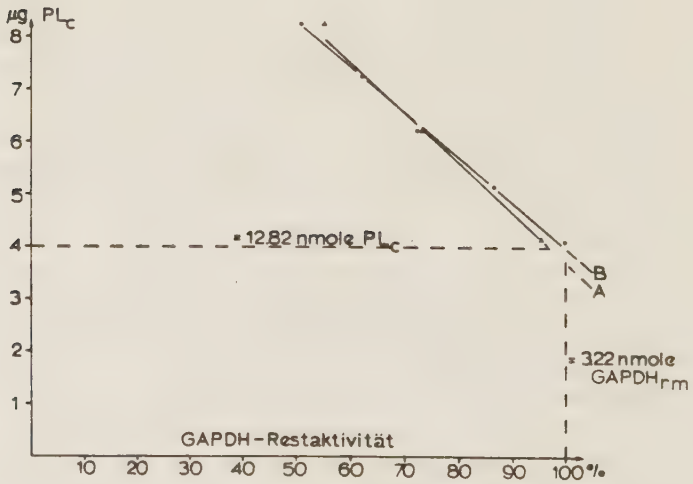


Abb. 3: Bestimmung der freien PL_c-Menge (µg) in den Dialyse-Kammern A u. B über die $GAPDH_{rm}$-Restaktivität (%).

2.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen mit anschl. Aktivitätsbestimmung

Bei der nach Methode 1.4.7.2 durchgeführten Elektrophorese war durch die angelegte elektrische Ladung keine Reaktivierung der gehemmten PL_c-modifizierten $GAPDH_{rm}$ durch Abspaltung des Inhibitors nachzuweisen. Das eingesetzte PL_c-modifizierte $GAPDH_{rm}$-Präparat blieb nach Beendigung der Elektrophorese enzymatisch inaktiv, wogegen die als Kontrolle miteingesetzte native $GAPDH_{rm}$ eine deutliche Enzym-Aktivität aufwies, wie anhand der gemessenen NADH-Fluoreszenz in Abb. 4 zu ersehen ist.

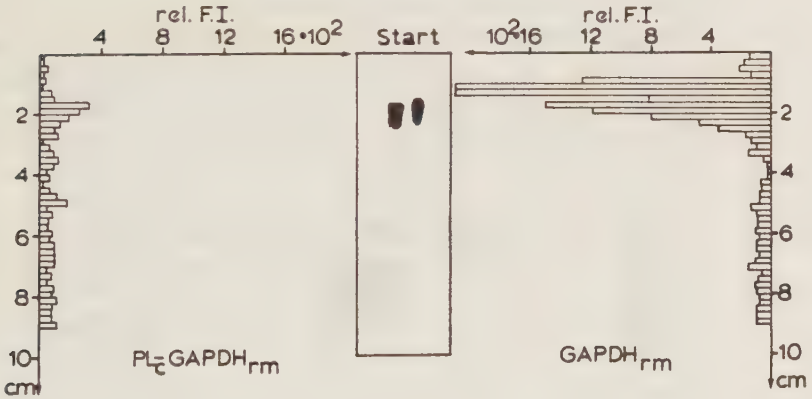


Abb. 4: Native Gelelektrophorese von $GAPDH_{rm}$ und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ mit anschließender Aktivitätsbestimmung über relative NADH-Fluoreszenz.

2.1.4 Isoelektrische Fokussierung

Durch die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) nach Methode 1.4.7.3 konnte keine Änderung der elektrischen Netto-Ladung des Enzyms $GAPDH_{rm}$ durch den Inhibitor PL_c nachgewiesen werden (s. Abb. 5).
Native wie auch PL_c-modifizierte $GAPDH_{rm}$ ergaben durch Vergleich eines Protein-Standards mit bekannten pI-Werten einen isoelektrischen Punkt von maximal pI 7,2. Dieser Wert lag damit in dem Bereich wie er für $GAPDH_{rm}$ in der Literatur beschrieben ist. Eine exakte Bestimmung des isoelektrischen Punktes ist bei $GAPDH_{rm}$ nicht möglich, da er von Konzentration und Typ des Elektrolyten abhängig ist (66).
Dieser Effekt könnte auch die Ursache für das Auftreten diffuser Protein-Banden nach der Anfärbung in der Elektrophorese (s. Abb. 4) und der isoelektrischen Fokussierung (s. Abb. 5) sein, die eine exakte Bestimmung des pI-Wertes nicht zuließen.

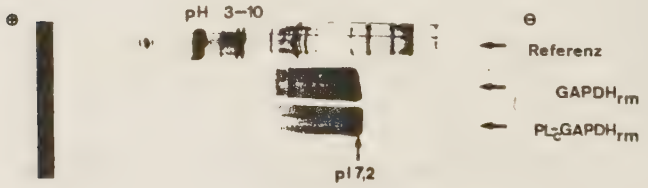


Abb. 5: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von $GAPDH_{rm}$ u. PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ (pI 7,2) durch Vergleich mit einem Protein-Standard nach dem System Servalyt-Precotes (38).

2.2.1 Quantitativer Test auf Pentalenolacton-Chlorhydrin

In diesem Versuch zeigte sich, daß neben einem qualitativen Nachweis aller Pentalenolactone aufgrund der GAPDH-Sensitivität (s. Kap.2.7)auch eine Mengen-Bestimmung an Pentalenolacton-Chlorhydrin aufgrund der nachgewiesenen Irreversibilität der PL_c-Bindung (s. Kap.2.1) über die $GAPDH_{rm}$-Hemmung möglich war.
Das angewandte, enzymatische Test-System nach Methode 1.5.1.1.4 stellte ein außerordentlich empfindliches Nachweisverfahren für PL_c im Nanogramm-Bereich über eine lineare Eichkurve dar (s. Abb. 6) und diente im weiteren zu einer exakten und schnellen Kontrolle von Pentalenolacton während der Schüttelkolben-Kulturen, Fermentationen, Aufarbeitung und Hemmaktivitätsbestimmungen.
Zur exakten Anwendung des Test-Systems war es von Vorteil die $Pentalenolacton_c$-Menge (ng) durch entsprechendes Verdünnen der Proben in einem Meßbereich der Eichkurve von 30...70% $GAPDH_{rm}$-Inhibition zu bestimmen.

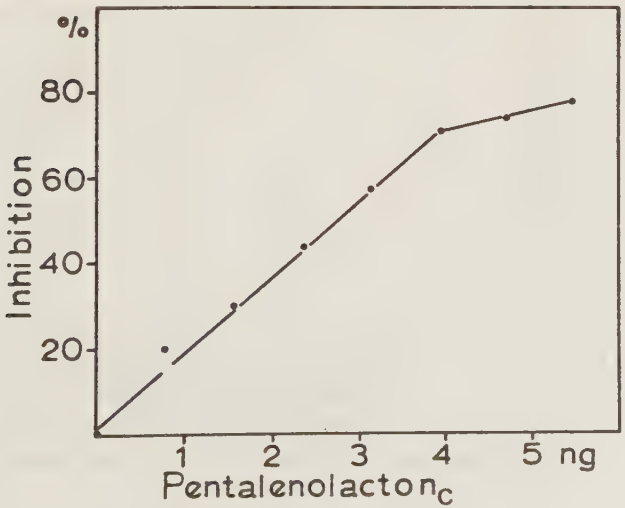


Abb. 6: Eichkurve zur Bestimmung von Pentalenolacton-Chlorhydrin.

2.2.2 Bestimmung der Stöchiometrie des Inhibitors PL_c mit seinem Wirkort $GAPDH_{rm}$

Bei der Titration (s. Methode 1.5.1.1.5), einer nach Lowry, H.O. et al. (33) bestimmten $GAPDH_{rm}$-Menge (Molekulargewicht: 144700 n. Ref. 34) mit bekannten Mengen des Inhibitors PL_c (Molekulargewicht: 312), resultierte über die $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivitäten ein molares Reaktionsverhältnis von 4 Mole PL_c zu 1 Mol $GAPDH_{rm}$ (Abb. 7).
Dies Ergebnis korreliert eindeutig mit dem strukturellen Aufbau der Kaninchen-Muskel-GAPDH aus 4 identischen Untereinheiten (34).

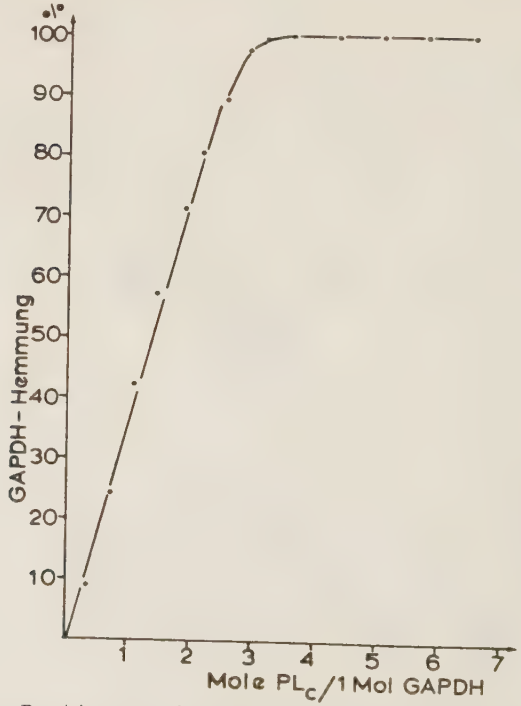


Abb. 7: Bestimmung des molaren Reaktionsverhältnis zwischen dem Inhibitor PL_c und dem Enzym $GAPDH_{rm}$ über die Hemmung (%).

Dieses Ergebnis konnte ebenfalls durch die in Kap. 2.1.2 dargestellten Ergebnisse der Gleichgewichts= dialyse gestützt werden (s. Abb. 3).

Aus allen durchgeführten Experimenten zur Irreversi= bilität der PL_c-Bindung an $GAPDH_{rm}$ unter Einwirkung verschiedener physikochemischer Kräfte war eine Abspaltung von Pentalenolacton-Chlorhydrin vom Enzym $GAPDH_{rm}$ nicht nachweisbar.
Zudem bestätigten die $GAPDH_{rm}$-Titrationen mit PL_c einen stöchiometrischen Verlauf der Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor.
Beide Versuchsreihen deuten aufgrund einer nachge= wiesenen hohen Bindungsfestigkeit auf eine kovalente Bindung zwischen reaktiven, funktionellen Gruppen von Pentalenolacton mit reaktiven Aminosäuren inner= halb der GAPDH-Struktur hin.

2.3.1 Experimente zur Enzym-Spezifität der Pentalenolacton-Wirkung

In dieser Versuchsreihe sollte über die Messung der enzymatischen Aktivität unterschiedlicher Enzyme (32) unter PL_c-Einfluß untersucht werden, wie spezifisch die Reaktion zwischen dem Sesquiterpen-Lacton PL_c und dem Enzym GAPDH ist.
Diese Test-Reihe umfaßte Enzyme, deren Substrate strukturelle Ähnlichkeiten zu D-GAP aufweisen oder die NAD als Coenzym binden und vorwiegend als "SH-Enzyme" charakterisiert sind.
Hierbei konnte die Enzym-Spezifität des Inhibitors PL_c über den Bereich der Glykolyse-Enzyme (13) hinaus veranschaulicht werden. Es zeigte sich, daß bei keiner der getesteten Enzyme eine Beeinträchtigung der kata= lytischen Aktivität durch PL_c nachweisbar war (s. Tab.4).

Enzym	Coenzym	Substrat	PL_c i.T.	Hemm-Test n. Bergmeyer, H. (32)
Alkohol-Dehydrogenase, Pferdeleber EC 1.1.1.1	NAD	Äthanol	0,05 mM	negativ
Lactat-Dehydrogenase, Schweineherz; Kaninchenmuskel EC 1.1.1.27	NAD	Lactat	0,05 mM	negativ
Malat-Dehydrogenase, Schweineherz EC 1.1.1.37	NAD	Malat	0,05 mM	negativ
Glutamat-Dehydrogenase, Rinderleber EC 1.4.1.3	NAD	Glutamat	0,05 mM	negativ
Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase, Kaninchenmuskel EC 1.1.1.8	NAD	Glycerin-3-Phosphat	0,05 mM	negativ
Triosephosphat-Isomerase, Kaninchenmuskel EC 5.3.11	NAD	Glycerin-aldehyd-3-Phosphat	0,05 mM	negativ
Lipoamid-Dehydrogenase, Schweineherz EC 1.6.4.3	NAD	Lipoamid	0,05 mM	negativ

Tab. 4: Einfluß des Inhibitors PL_c auf die katalytische Aktivität verschiedener Enzyme (Teil I).

Enzym	Coenzym	Substrat	PL_c i.T.	Hemm-Test n. Bergmeyer, H. (32)
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Hefe EC 1.1.1.44	NADP	6-Phospho-gluconat	0,05 mM	negativ
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase, Hefe; Leuconostoc mesen. EC 1.1.1.49	NADP	Glucose-6-Phosphat	0,05 mM	negativ
Isocitrat-Dehydrogenase, Schweineherz EC 1.1.1.42	NADP	Isocitrat	0,05 mM	negativ
3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, Rhodopseudo. sph. EC 1.1.1.30	NAD	3- Hydroxy-butyrat	0,05 mM	negativ
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, Schweineherz EC 1.1.1.35	NAD	S-Aceto-acetyl-CoA	0,05 mM	negativ
Glycerokinase, Candida mycoderma EC 2.7.1.30	ATP	Glycerin	0,05 mM	negativ
Glyoxalase I, Hefe EC 4.4.1.5	GSH	Methylglyoxal	0,05 mM	negativ

Tab. 4: Einfluß des Inhibitors PL_c auf die katalytische Aktivität verschiedener Enzyme (Teil II).

Ebenfalls war durch die hierbei eingesetzte Inhibitor-Konzentration keine Hemmung der katalytischen Aktivität des Enzyms Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40) festzustellen. Dies steht im Gegensatz zu der bei Lemke, J. (6) beschriebenen Wirkung von Pentalenolacton auf die Pyruvat-Kinase.
Es zeigte sich, daß die Inhibitor-Wirkung von PL_c ausschließlich bei GAPDH's unterschiedlicher Species auftritt und dabei in Bezug auf das Ausmaß der katalytischen Hemmung noch einem verstärkenden Einfluß von NAD unterliegt (s. Ref. 29, 67), wie Abb. 8 zeigt.

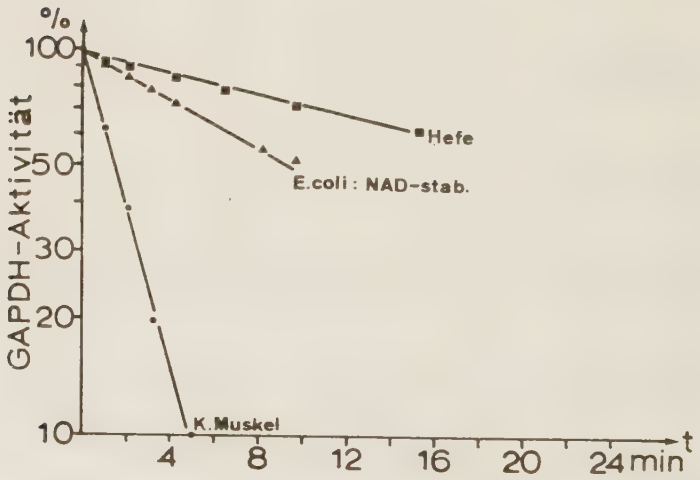


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der Pentalenolacton-Chlorhydrin-Wirkung (2 µM) auf GAPDH's unterschiedlicher Species (0,336 µM):
Hefe (■——■): kein gebundenes NAD,
E.coli (▲——▲): NAD-stabilisiert ,
Kaninchen-Muskel (•——•): gebundenes NAD.

Abschließend läßt sich durch die hier dargestellten Ergebnisse zur Enzym-Spezifität, im Zusammenhang mit den von Hartmann, S. (29) und Mann, K.-H. et al. (67) veröffentlichten Arbeiten, eine äußerst hohe Enzym-Spezifität des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton erkennen, da ausschließlich GAPDH's und in dieser Enzym-Familie bevorzugt GAPDH's mit NAD als Coenzym (EC 1.2.1.12) von dieser Hemmwirkung betroffen sind.
Interessant sind hierbei die von Maurer, et al. durchgeführten Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung einer Pentalenolacton-insensitiven GAPDH aus dem Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae (25).

2.3.2 Experimente zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen enzymgebundenem NAD und PL_c

Der in Kap.2.3.1 beschriebene kooperative Effekt von NAD auf die GAPDH-Hemmung durch PL_c sollte anhand unterschiedlicher NAD-Beladungen der Kaninchenmuskel-GAPDH, die bis zu 4 Mole NAD fest binden kann (36), nach Methode 1.5.1.3.1 untersucht werden.
Einen Einfluß auf das Ausmaß der $GAPDH_{rm}$-Hemmung durch eine direkte Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen, gebundenen Coenzym-Mengen mit dem Inhibitor PL_c konnte nicht festgestellt werden. Die Inhibitorwirkung von PL_c bei $GAPDH_{rm}$ trat unabhängig von der Menge an gebundenem NAD auf, da auch der Einsatz NAD-freier $GAPDH_{rm}$ (s. Methode 1.4.4) eine vollständige Inhibition der enzymatischen Aktivität zeigte, wie in Abb. 9 dargestellt ist.

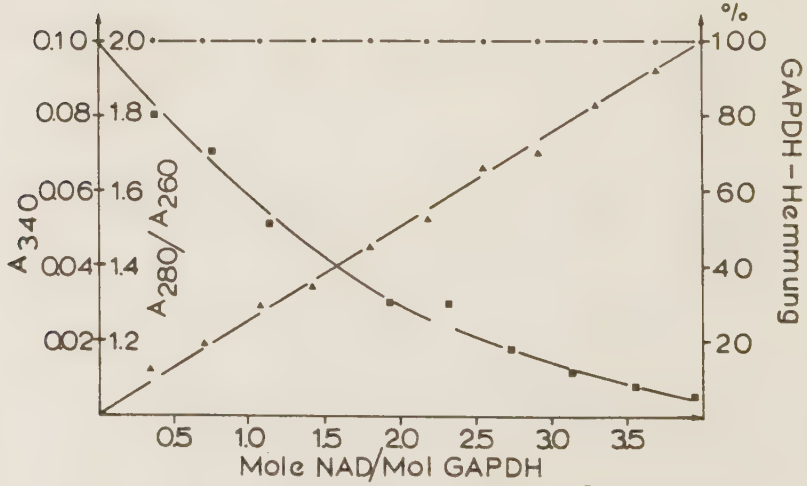


Abb. 9: Abhängigkeit der PL_c-Wirkung (160 µM; •——•) von 14 µM $GAPDH_{rm}$ mit unterschiedlicher NAD-Beladung gemessen enzymatisch nach Methode 1.5.1.3.1 (▲——▲) sowie über A_{280}/A_{260} (■——■) nach 48 h Inkubation.

2.4 Modifizierungsexperimente an nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$

Durch die spektroskopische Bestimmung reaktiver Aminosäuren (Cystein, Lysin) über eine Modifizierung mit geeigneten Reagentien, sollte ein Unterschied in der Anzahl dieser modifizierten Aminosäuren bei nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ erkennbar sein, der auf eine Aminosäure-Position für die Bindung von Pentalenolacton hinweist.

2.4.1 Bestimmung der SH-Gruppen in $GAPDH_{rm}$

2.4.1.1 Bestimmung der SH-Gruppen nach Ellmann (43)

2.4.1.1.1 Bestimmung der Gesamt-Anzahl von SH-Gruppen

Die SH-Gruppen-Bestimmungen wurden unter verschiedenen Bedingungen nach Methode 1.5.1.2.1 durchgeführt, da es je nach Test-Bedingungen, wie eingesetzte Protein-Menge, pH-Wert, Art des Denaturierungsreagenz zu gewissen Schwankungen bei der Bestimmung der Anzahl an SH-Gruppen innerhalb der $GAPDH_{rm}$ kommen kann. Die Anzahl der modifizierten Cystein-Reste sind unter Berücksichtigung der verschiedenen Test-Bedingungen in Tab. 5 zusammengefaßt und wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Anzahl d. SH-Grp.} = \frac{E_{412nm} \times \text{Vol.}_{Küv} \times MG_{GAPDH}}{\varepsilon_{mol} \times mg_{Protein\ i.T.}},$$

wobei

E_{412nm} : Extinktion bei λ: 412 nm,

$Vol._{Küv}$: Volumen d. Tests i. d. Küvette (ml),

MG_{GAPDH} : Molekulargewicht v. $GAPDH_{rm}$: 144700,

ε_{mol} : molarer Extinktionskoeffizient des DTNB-modifizierten Cystein-Restes: 13600 $M^{-1}cm^{-1}$

darstellt.

2.4.1.1.2 Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen

Die Bestimmung, der für die katalytische Aktivität bei $GAPDH_{rm}$ essentiellen SH-Gruppe in der Aminosäuresequenz-Position 149 (s.34), machte den Einsatz von coenzym (NAD-)-freier $GAPDH_{rm}$ (s. Methode 1.4.4) notwendig.
Hierbei wurde das Apo-Enzym einem gesonderten Test-System ohne denaturierende Agentien unterworfen. Unter Zuhilfenahme eines Schreibers konnte die Extinktionsänderung bei λ: 412 nm nach Zugabe des Modifizierungsreagenzes DTNB über einen Zeitraum von 15 min verfolgt werden, wobei nur die freien, reaktiven Cystein-Reste modifiziert werden (s. Abb.10).
Die nach 15 minütiger Reaktionsdauer konstante Extinktion ging in die obige Formel ein. Die erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 5 dargestellt.

Medium	pH	minimale Protein-Menge$_{i.T.}$	Inkubation	SH-Grp./1 Mol GAPDH$_{rm}$	
				GAPDH$_{rm}$	PL$_c$-GAPDH$_{rm}$
0,08 M Na-Pyrophosphat 1,5 mM EDTA 8 M Harnstoff	8,0	0,58 mg	1h, 25°C	12,8	11,5
0,08 M Na-Pyrophosphat 1,5 mM EDTA 8 M Harnstoff	8,0	0,31 mg	2h, 25°C	13,1	11,9
0,05 M Na-Pyrophosphat 10 mM EDTA 8,6 M Guanidin	8,3	0,38 mg	1h, 25°C	11,4	10,7
0,05 M Na-Pyrophosphat 10 mM EDTA 8,6 M Guanidin	7,7	1,00 mg	1h, 25°C	11,4	10,7
0,05 M Na-Pyrophosphat 5 mM EDTA	7,5	2,36 mg	20 min	5,0	2,7

Tab. 5: Bestimmung der gesamten und freien, reaktiven SH-Gruppen bei nativer und PL$_c$-behandelter GAPDH$_{rm}$ mittels Ellmann's Reagenz (DTNB).

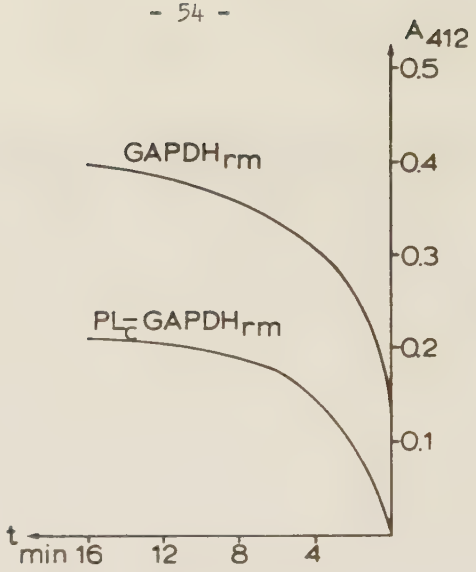


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der DTNB-Reaktion bei nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ zur Bestimmung reaktiver SH-Gruppen.

2.4.1.2 Bestimmung der SH-Gruppen mittels para-Hydroxymercuribenzoat

Um eine sichere Aussage bei der Bestimmung der reaktiven SH-Gruppe Cystein-149 (34) machen zu können, wurde noch eine zusätzliche Methode der SH-Gruppen-Bestimmung nach 1.5.1.2.2 durchgeführt.
Hierzu wurden die SH-Gruppen in nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ mittels p-HMB titriert, wobei die Methode mit reduziertem Glutathion als Standard kontrolliert wurde.
Es erfolgte wieder eine Bestimmung der gesamten und der freien, reaktiven SH-Gruppen.
Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Medium	pH	Protein-Konz. i.T.	pHMB-Konz.	SH-Grp./1 Mol $GAPDH_{rm}$	
				$GAPDH_{rm}$	PL_c-$GAPDH_{rm}$
0,33 M Na-Acetat 2% SDS	4,6	$2,3 \times 10^{-6}$M	$3,6 \times 10^{-4}$M	7,4	6,8
0,33 M Na-Acetat 2% SDS	4,6	$4,5 \times 10^{-6}$M	$3,6 \times 10^{-4}$M	8,0	6,5
0,33 M Na-Acetat 2% SDS	4,6	$7,5 \times 10^{-6}$M	$3,6 \times 10^{-4}$M	8,0	6,7
0,05 M Na-Pyrophosphat	7,5	$2,7 \times 10^{-6}$M	$5,2 \times 10^{-4}$M	4,1	4,1

Tab. 6: Bestimmung der gesamten und freien, reaktiven SH-Gruppen bei nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ mittels para-Hydroxymercuribenzoat.

Zusammenfasssend war bei den durchgeführten SH-Gruppen-Bestimmungen durch keine der angewandten Methoden eine signifikante Differenz in der Anzahl an modifizierten SH-Gruppen zwischen nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ nachweisbar. Dies gilt auch für die gesondert bestimmte SH-Gruppe des Cystein-Restes 149 (s. Tab.5 u. Tab.6). Wie beschrieben (34), ist die Kaninchenmuskel-GAPDH aus 4 identischen Untereinheiten mit insgesamt 16 Cystein-Resten aufgebaut, von denen 4 Cystein-Reste mit der Aminosäuresequenz-Position 149 als essentiell für die katalytische Aktivität gelten.
Eine kovalente Bindung von PL_c an die SH-Gruppe eines Cystein-Restes hätte demnach eine Differenz in der Anzahl an SH-Gruppen von nativer zu PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ von 4 Cystein-Resten bedingt, was mit einer Stöchiometrie der Inhibitor/Enzym-Reaktion von 4 Mole PLc zu 1 Mol $GAPDH_{rm}$ korreliert hätte (s. 2.2.2).

Diese Differenz trat in keine der Experimente auf, sodaß ein Cystein-Rest innerhalb der $GAPDH_{rm}$-Struktur als Bindungsposition für den Inhibitor Pentalenolacton ausgeschlossen werden kann.

2.4.2 Bestimmung der Lysin-Reste in $GAPDH_{rm}$

2.4.2.1 Bestimmung der Gesamt-Anzahl an freien ε-Amino-Gruppen

Mit dem Modifizierungsreagenz TNBS wurde über die Extinktion bei λ: 335 nm die Anzahl an TNBS-modifizierten, freien ε-Amino-Gruppen (ε_{mol}:9950 $M^{-1}cm^{-1}$) insbesondere von Lysin in nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ bestimmt.
Bei diesen Experimenten wurde das NAD-freie Enzym (s. Methode 1.4.4) eingesetzt.
Die nach Methode 1.5.1.2.3. erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

2.4.2.2 Bestimmung der reaktiven ε-Amino-Gruppen von Lysin mittels Pyridoxal-5'-Phosphat

Neben der aufgrund der hohen Gesamt-Anzahl nur bedingt aussagekräftigen Bestimmung an freien ε-Aminogruppen bei nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$, konnte auch eine spezifischere Bestimmung von reaktiven Lysin-Resten nach Methode 1.5.1.2.4 vorgenommen werden.
Hierbei galt dem Lysin-Rest in der Aminosäuresequenz-Position 191 (34) besonderes Interesse, da er an der Bindung des für die katalytische Aktivität von $GAPDH_{rm}$ notwendigen Phosphats beteiligt ist (48). Weitere durch PALP modifizierbare Lysin-Reste befinden sich in Aminosäuresequenz-Position 2 und 212.

Die spektroskopische Bestimmung der Anzahl dieser PALP-modifizierten Lysin-Reste (ε_{mol}:9710 $M^{-1}cm^{-1}$) in nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ erfolgte nach der Aufnahme von UV-Spektren (Abb.11) über die Extinktion bei λ: 325 nm.
Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

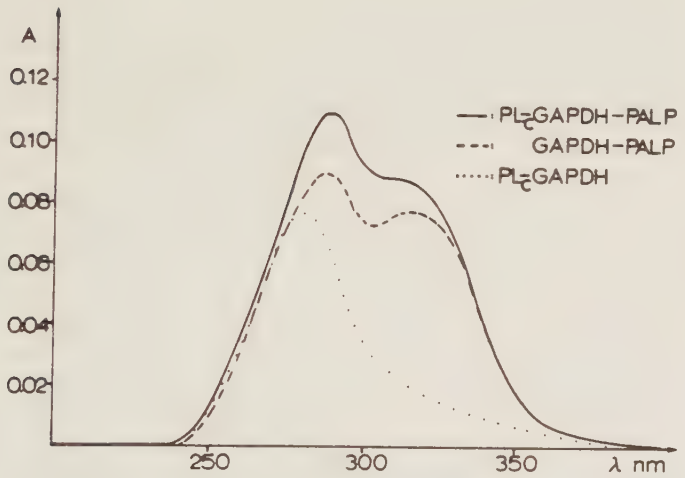


Abb. 11: Spektroskopische Bestimmung PALP-modifizierter Lysin-Reste in nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ (ca. 0,17 mg/ml).

Medium	pH	Protein-Konz.$_{i.T.}$	Konz. des Modifiz.-Reagenz$_{i.T.}$	ε-Amino-Grp./1 Mol GAPDH$_{rm}$	
				GAPDH$_{rm}$	PL$_c$-GAPDH$_{rm}$
0,05 M Na-Pyrophosphat 1 mM EDTA	9,25	0,1 mg/ml	2 mM TNBS	114	113
0,05 M Na-Pyrophosphat 5 mM EDTA	7,5	2,5 mg/ml	10 mM PALP	10,5	10,5

Tab. 7: Bestimmung der gesamten und reaktiven Lysin-Reste bei nativer und PL$_c$-behandelter GAPDH$_{rm}$.

Weder die nur bedingt aussagekräftige Methode zur Bestimmung der Gesamt-Anzahl von freien ε-Amino-Gruppen mittels TNBS, noch die spezifischere Methode der Lysin-Modifizierung mittels PALP, zeigten eine Differenz von 4 modifizierten Lysin-Resten der nativen zu PL$_c$-behandelten GAPDH$_{rm}$. Ein Hinweis der Beteiligung eines Lysin-Restes bei der Bindung des Inhibitors Pentalenolacton war somit nicht gegeben.

2.4.3 Experimente zum Nachweis einer Beteiligung von Arginin-Resten bei der PL_c-Bindung an $GAPDH_{rm}$

2.4.3.1 Modifizierung von Arginin-Resten durch Methylglyoxal

Durch Modifizierung eines reaktiven Arginin-Restes (Arginin-231: s. Ref.52) innerhalb der Substrat-Bindungsstelle bei $GAPDH_{rm}$ mittels Methylglyoxal nach Methode 1.5.1.2.5 sollte über die enzymatische Aktivität der Einfluß auf die PL_c-Bindung untersucht werden.
Hierbei konnte je nach Reihenfolge der Inkubation der Reaktionspartner folgender Einfluß auf die katalytische Aktivität von $GAPDH_{rm}$ (nach Methode: 1.5.1.1.4) festgestellt werden:

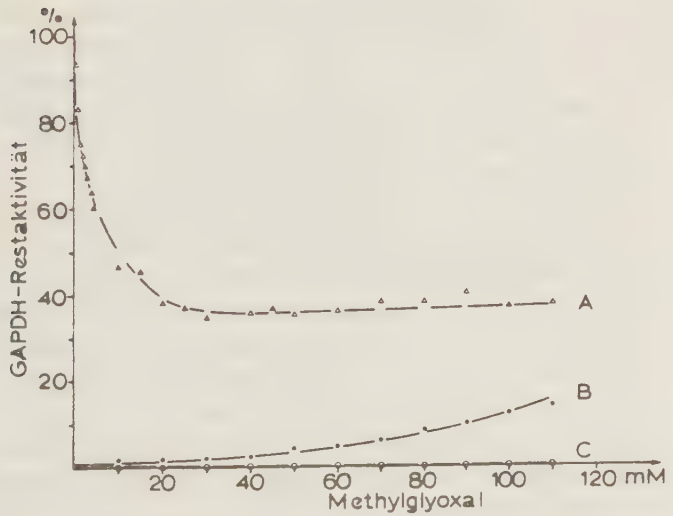


Abb. 12: Abhängigkeit der PL_c-Wirkung ($GAPDH_{rm}$-Restaktivität: %) von der Methylglyoxal-Konzentration (mM): A: Kontrolle,
B: gleichzeitige Zugabe von Methylglyoxal u. PL_c
C: Zugabe v. Methylglyoxal nach 60 min PL_c-Inkubation.

Bei vorheriger 60 minütiger Inkubation von PL_c mit $GAPDH_{rm}$ und anschließender Zugabe von steigenden Methylglyoxal-Konzentrationen war kein Einfluß auf die enzymatische Aktivität erkennbar (s. Abb. 12: Kurve C).
Dagegen zeigte eine gleichzeitige Zugabe von PL_c mit steigenden Methylglyoxal-Konzentrationen einen Anstieg der $GAPDH_{rm}$-Restaktivität (s. Abb. 12: Kurve B) bis auf Werte in den Bereich der Kontroll-Kurve. Die Kontrolle (s. Abb. 12: Kurve A) zeigt den Einfluß der steigenden Methylglyoxal-Konzentrationen auf $GAPDH_{rm}$ ohne PL_c-Zugabe.
Dieser Einfluß der Reaktionspartner auf die katalytische Aktivität bei $GAPDH_{rm}$ ließ auf ein kompetitives Verhalten von PL_c und Methylglyoxal um die Bindungsposition innerhalb der Substrat-Bindungsstelle unter Beteiligung eines Arginin-Restes schließen.
Ein weiterer Versuch, der die Beteiligung der Substrat-Bindungsstelle bei der $GAPDH_{rm}$-Inhibition stützte, bestand in einer vorherigen Zugabe des Substrates D-GAP in das Test-System nach Methode 1.5.1.1.4 mit anschließendem Einsatz von PL_c.
Bei dieser Versuchsanordnung kam es zu keiner Beeinträchtigung der Enzym-Katalyse. Ein normaler Ablauf der katalytischen Aktivität war zu beobachten.
Auch bei gleichzeitiger Zugabe von D-GAP mit PL_c überwiegt die Affinität des Enzyms $GAPDH_{rm}$ zu seinem Substrat D-GAP, und eine Hemmung der Enzym-Katalyse findet nicht statt.
Erst bei einminütiger Inkubation von PL_c mit $GAPDH_{rm}$ und anschließender Zugabe von D-GAP kam es zur Hemmung des Enzyms.

2.4.3.2 Einfluß von Pentalenolacton-Chlorhydrin auf die proteolytische Wirkung von Clostripain

Bei den Versuchen zum Nachweis der Beteiligung von Arginin-Resten bei der Inhibitor-Bindung innerhalb der $GAPDH_{rm}$ wurde die Arginin-spezifische Protease Clostripain zur Proteolyse von nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ eingesetzt (nach Methode: 1.4.8.1`.

Wie in Abb.13,der zur Kontrolle durchgeführten SDS-Gelelektrophorese nach Methode 1.4.7.1,zu sehen ist, fand über einen Zeitraum von 100 h bei 29°C im Inkubationsansatz keine Proteolyse von nativer $GAPDH_{rm}$, die das katalytische Zentrum betrifft, statt (s. Abb.14`.

Dagegen wurde bei Zusatz von PL_c in den Inkubationsansatz zum Zeitpunkt 100 h die $GAPDH_{rm}$ innerhalb der nächsten 7 h total hydrolysiert (s. Abb.13).

Das gleiche Phänomen zeigte sich auch bei dem Einsatz von Clostripain bei nativer und PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$ in getrennten Inkubationsansätzen.

Bei der weiteren Untersuchung von PL_c auf die proteolytische Wirkung von Clostripain konnte nachgewiesen werden , daß eine Minimal-Konzentration von 1 mM NAD im Inkubationsansatz notwendig war, diesen Schutz vor einer Proteolyse durch Clostripain herbeizuführen (s. Abb14).

Da bekannt ist, daß $GAPDH_{rm}$ bis zu 4 Mole NAD pro 1 Mol $GAPDH_{rm}$ fest binden kann und dem Enzym dadurch Stabilität und Schutz reaktiver Aminosäure-Reste wie Lysin-183 und Cystein-149 (28) bietet, darf auch in dem hier beschriebenen Fall der Schutz eines reaktiven Arginin-Restes innerhalb der Substrat-Bindungsstelle durch NAD vermutet werden, der durch den Inhibitor PL_c aufgehoben wird.

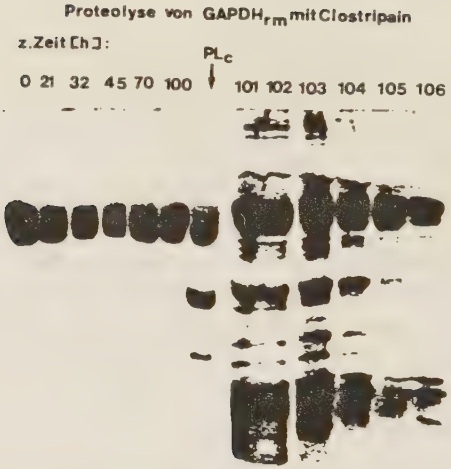


Abb. 13: Darstellung der proteolyse-induzierenden Wirkung von PL$_c$ mittels Clostripain bei NAD-stabilisierter GAPDH$_{rm}$ (1 mM NAD) durch SDS-Gelelektrophorese nach 1.4.7.1.

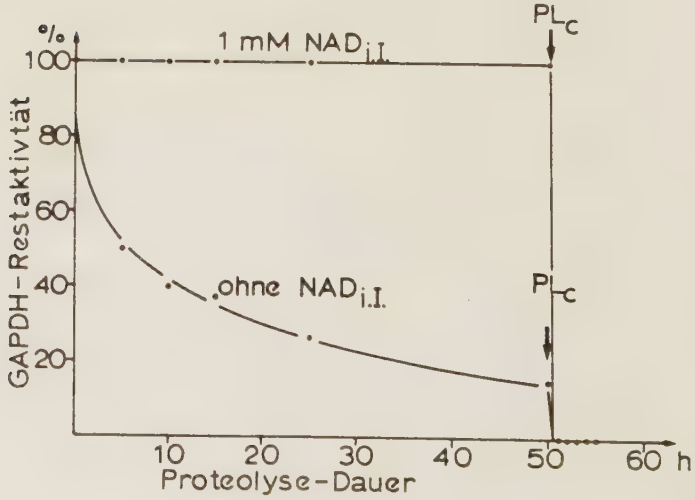


Abb. 14: Kontrolle der enzymatischen Aktivität von GAPDH$_{rm}$ während der Clostripain-Proteolyse im NAD-freien u. NAD-stabilisierten Ansatz.

2.4.4 Isolierung und Identifizierung tritiummarkierter PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$-Peptide mittels HPLC

Die Methode der Modifizierung von $GAPDH_{rm}$ mit tritiummarkiertem PL_c (^3H-PL_c) und anschließender Trypsinolyse (s. Methode 1.4.8.1) führte über das HPLC-System nach Methode 1.5.1.4 (Abb.15) zur Isolierung von 4 tritiummarkierten Peptiden, die nach Rechromatographie (Abb.16) und saurer Peptid-Hydrolyse (s. Methode 1.4.5) mittels automatischer Aminosäure-Analyse folgende molare Aminosäure-Zusammensetzungen zeigten:

Aminosäuren	molare Aminosäure-Zusammensetzung Peptid I	Peptid II	Peptid III	Peptid IV
Cysteinsäure	2	/	/	/
Asparaginsäure	4	1	3	1
Threonin	3	2	2	2
Serin	2	/	2	/
Glutaminsäure	2	2	2	2
Prolin	1	/	/	/
Glycin	2	2	3	2
Alanin	5	2	3	2
Valin	3	1	3	1
Methionin	<1	<1	<1	<1
Isoleucin	3	1	2	1
Leucin	3	1	3	1
Tyrosin	/	/	1	/
Phenylalanin	1	1	1	1
Lysin	2	1	2	1
Histidin	2	2	1	1
Aminosäure-Sequenz-Position	143-183	160-183	X	160-183

Tab. 3: Molare Aminosäure-Zusammensetzung der isolierten tritiummarkierten $GAPDH_{rm}$-Peptide.

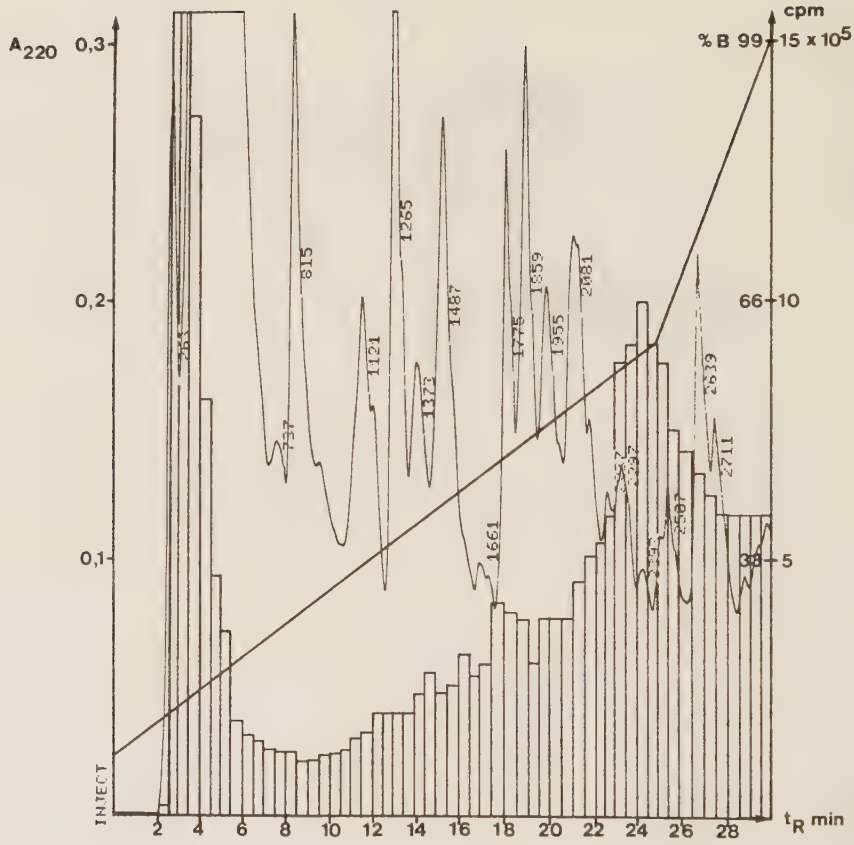


Abb. 15: Isolierung ^{3}H-PL$_{c}$-markierter Peptide nach Trypsinolyse von ^{3}H-PL$_{c}$-modifizierter GAPDH$_{rm}$ mittels HPLC nach Methode 1.5.1.4.:
A_{220}: Absorption bei λ: 220 nm;
% B : Gradienten-Verlauf der Komponente B;
cpm : Tritium-Zählrate pro Minute (▭).

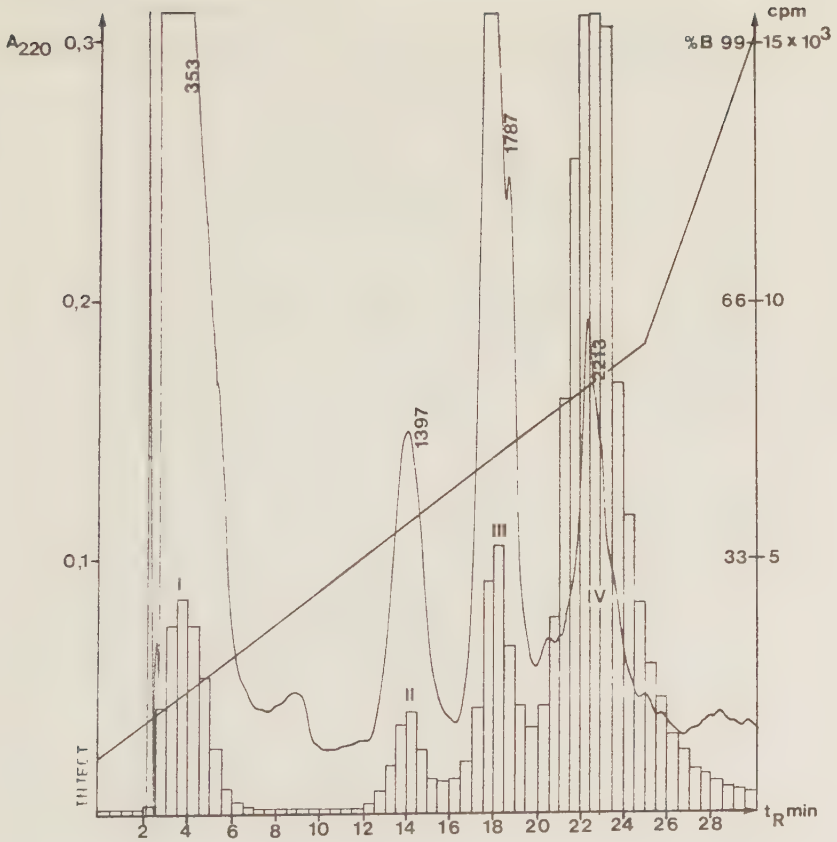


Abb. 16: Rechromatographie der isolierten ^{3}H-PL_c-markierten Peptide mittels HPLC nach Methode 1.5.1.4.:
A_{220}: Absorption bei λ: 220 nm;
% B : Gradienten-Verlauf der Komponente B;
cpm : Tritium-Zählrate pro Minute (▭).

Bei den identifizierten, durch ^{3}H-PL_c tritiummarkierten Peptiden handelte es sich, wie Abb. 17 zeigt, um eine die Aminosäure-Positionen 160-183 umfassende Teilsequenz von $GAPDH_{rm}$, die drei Histidin-Reste enthält. Von diesen drei Histidin-Resten waren in Peptid II (t_R: 13,97 min) zwei Histidin-Reste nachweisbar und wiesen somit auf einen durch ^{3}H-PL_c- markierten und -modifizierten Histidin-Rest hin.
Peptid IV (t_R: 22,13 min) zeigte noch einen identifizierbaren Histidin-Rest, woraus zwei ^{3}H-PL_c-markierte und -modifizierte Histidin-Reste resultierten. Die Markierung von zwei Histidin-Resten in der Teilsequenz von Position 160-183 durch ^{3}H-PL_c war auch an den Tritium-Zählausbeuten (cpm) der isolierten Peptide erkennbar (Abb. 16).
Das tritiummarkierte Peptid I (t_R: 3,53 min) konnte als Teilsequenz der $GAPDH_{rm}$ mit den Aminosäure-Positionen 143-183 identifiziert werden, welche den für die katalytische Aktivität essentiellen Cystein-Rest 149 (28) enthält und sich direkt an die Teilsequenz mit den Aminosäure-Positionen 160-183 der ^{3}H-Peptide II und IV anschließt (Abb. 17).
Ein weiteres isoliertes, tritiummarkiertes Peptid (Peptid III: t_R: 17,87 min) umfaßte ebenfalls die Histidin-enthaltende Teilsequenz der Aminosäure-Positionen 160-183, jedoch wurden auch noch andere Aminosäuren, wie Tyrosin identifiziert, welche keiner eindeutigen Teilsequenz zugeordnet werden konnten.
Die in Abb. 17 dargestellte, durch ^{3}H-PL_c tritiummarkierte Teilsequenz stellt eine phylogenetisch konservative Sequenz innerhalb der $GAPDH_{rm}$ dar (69), die einen für die katalytische Aktivität weiteren essentiellen Aminosäure-Rest enthält, der als Histidin 176 identifiziert wurde. Histidin 176 könnte somit als nucleophile Angriffsposition (70) für die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem Enzym $GAPDH_{rm}$ und dem Inhibitor Pentalenolacton in Frage kommen.

Die Aminosäure-Zusammensetzungen der durch ^{3}H-PL_c tritiummarkierten $GAPDH_{rm}$-Peptide konnten über die bekannte Aminosäure-Sequenz von Kaninchenmuskel-GAPDH (68) folgender Teilsequenz innerhalb des Enzyms zugeordnet werden:

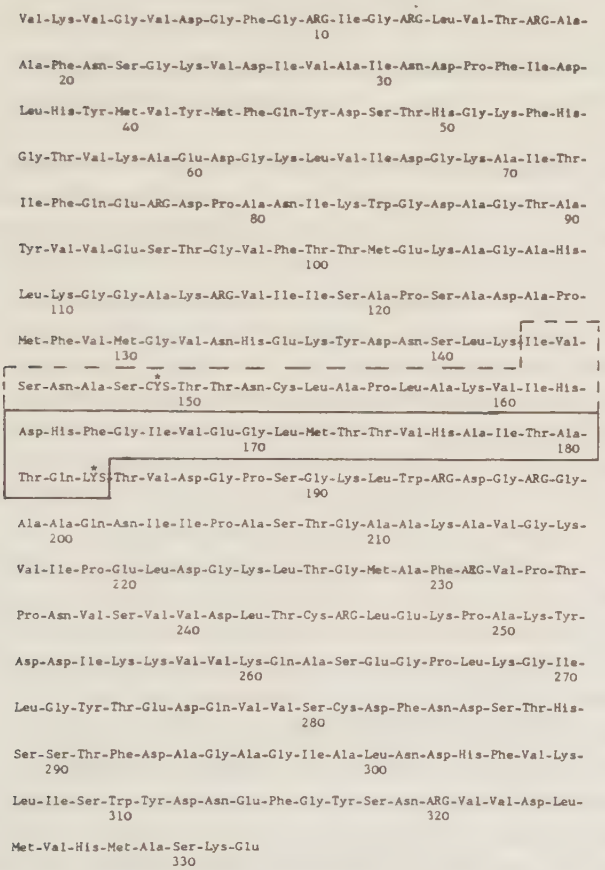


Abb. 17: Aminosäure-Sequenz von Muskel-GAPDH nach Ref. 68.

Die Experimente zur Modifizierung von Argininresten durch Methylglyoxal und D-GAP, wie auch die Abhängigkeit der Proteolyse-Wirkung des Clostripains unter PL_c-Einfluß zeigten eine Beteiligung der Substrat-Bindungsstelle von $GAPDH_{rm}$ bei der Hemmung durch den Inhibitor PL_c.
Inwieweit die Substrat-Bindungsstelle als Pentalenolacton-Bindungsposition über einen reaktiven Arginin-Rest dient, kann nicht eindeutig beantwortet werden.
Eine kovalente Bindung von PL_c mit einem reaktiven Arginin-Rest ist jedoch nicht wahrscheinlich, da eine solche Bindung in der Aminosäuresequenz von $GAPDH_{rm}$ als Schnittstelle für die Protease Clostripain nicht erkennbar und/oder zugänglich wäre.
Dies steht jedoch im Gegensatz zur beobachteten bevorzugten Proteolyse von Clostripain bei PL_c-modifizierter $GAPDH_{rm}$. Vielmehr könnte durch PL_c eine Protektion des reaktiven Arginin-Restes über eine Verdrängung des Coenzyms NAD aufgehoben werden, sodaß eine Proteolyse durch Clostripain erfolgen kann.

Bei den Experimenten zur Isolierung ^3H-PL_c-markierter und -modifizierter Peptide aus $GAPDH_{rm}$ wurde eine Teilsequenz identifiziert, die phylogenetisch eine konservative Aminosäure-Sequenz darstellt und somit auch bei GAPDH's unterschiedlicher Species auftritt. Diese Teilsequenz enthält den für die katalytische Aktivität der $GAPDH_{rm}$ wichtigen Aminosäure-Rest Histidin-176, der als nucleophile Angriffsposition über eine kovalente Bindung für den GAPDH-Inhibitor Pentalenolacton dienen könnte und auch dessen hohe Enzym-Spezifität erklärt.

2.5 Nährmedium-Optimierung, Fermentation und Produkt-Isolierung bei dem Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae Tü 469

Das Erreichen maximaler Pentalenolacton-Ausbeuten sollte über die Optimierung des Nährstoff-Systems und der Prozeß-Führung bei den Fermentationen sowie anschließender schonender Aufarbeitung des Kultur-Filtrats erzielt werden.

2.5.1 Nährmedium-Optimierung bei Streptomyces arenae Tü 469

Ausgehend vom synthetischen Minimal-Medium nach 1.5.2.1.1 wurden die aus dem quantitativen Test auf Pentalenolacton-Chlorhydrin nach Methode 1.5.1.1.4 (µg PL_c) sowie aus der Trockengewichts-bestimmung nach Methode 1.4.6 (g BTM) pro einge-setztem Substrat (g D-Mannit) erhaltenen Ausbeuten ($Y_{B/S}$: g BTM/g D-Mannit; $Y_{P/S}$: µg PL/g D-Mannit) gegen die variierten Parameter Schüttelfrequenz, pH-Wert, Phosphat-, L-Asparagin-, Calcium-Konzen-tration und C-Quellen aufgetragen, wobei jeder optimierte Parameter in die nächste Test-Reihe einging.

2.5.1.1 Belüftungsoptimierung

In dieser Test-Reihe wurde mit steigender, rotierender Schüttelfrequenz (rpm) eines In-kubationsschüttlers in Schikanekolben nach Methode 1.5.2.1.3 die PL-Bildung untersucht. Die hierbei erzielte größte PL-Produktion lag bei maximaler Schüttelfrequenz (80...100 rpm) und verlief parallel zur Biomassen-Bildung. Einen Grenzwert der Schüttelfrequenz bzw. Be-lüftung, welcher ein Optimum an PL erbringt, war nicht feststellbar. Eine durch gebildetes Mycel eintretende Sauerstoff-Limitierung, die eine Stimulierung des Sekundär-Metabolismus

einleiten könnte, trat somit nicht auf (Abb. 18).

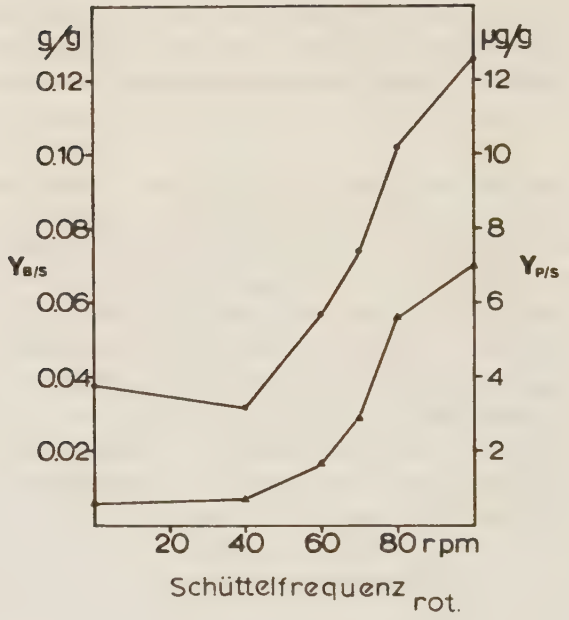


Abb. 18: Einfluß der Schüttelfrequenz (rpm) auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (•——•) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▲——▲).

2.5.1.2 pH-Optimierung

Durch Auswahl zweier Puffer-Systeme (66mM HEPES; 66mM MES) anstelle des Phosphat-Puffers wurde der pH-Bereich von pH 5,5...8,0 variiert.
Zum Ausgleich der Phosphat-Konzentration des im vorhergehenden Versuch verwendeten Phosphat-Puffers wurden entsprechende Mengen an K_2HPO_4 x $3H_2O$ zugesetzt. Vor und nach Beendigung der Test-Reihe wurde der pH-Wert auf Konstanz überprüft.
Es zeigte sich im alkalischen Bereich bei pH 7,45 ein optimales Zell-Wachstum. Oberhalb pH 7,45 war die Bildung von Biomasse stark eingeschränkt und die PL_C-Bildung sogar aufgehoben.
Unterhalb pH 7,45 beginnt eine Verminderung an Biomasse bis auf einen konstanten Wert. Hierbei zeigte der Streptomycet eine erhebliche Säure-Toleranz. In einem pH-Bereich von 6,8...5,65 blieb die Biomasse und die PL-Ausbeute konstant (Abb. 19).
Das pH-Optimum für die Pentalenolacton-Bildung zwischen pH 7,1...7,45 resultierte aus einer erhöhten Biomasse-Bildung, da das Verhältnis zwischen Primär- zu Sekundär-Metabolismus noch weitestgehend auf der Seite des Primär-Stoffwechsels lag. Bei Betrachtung der spezifischen Ausbeute ($Y_{P/S}/Y_{B/S}$; Abb. 24) war dieses Verhältnis erst im Bereich von pH 6,8...5,65 optimal in Bezug auf die Sekundär-Metabolit-Bildung.

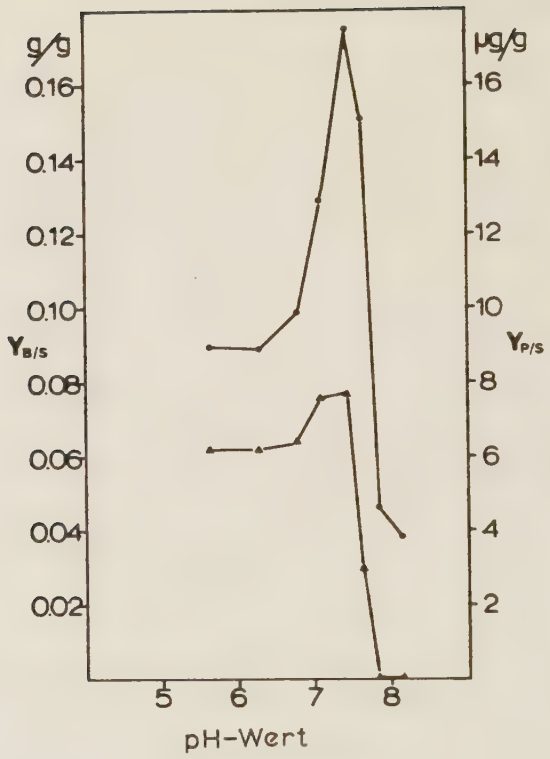


Abb. 19: Einfluß des pH-Werts im Kultur-Medium auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (•——•) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▲——▲).

2.5.1.3 Optimierung der Phosphat-Konzentration

Aufgrund von Experimenten, die den Einfluß anorganischen Phosphats bei der Sekundär-Metabolit-Biosynthese verschiedener Mikroorganismen (71) beschreibt, wurde auch der vorliegende Streptomycet auf diesen Einfluß hin überprüft.
Um nur eine Phosphat-Quelle ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$) einzusetzen, wurde das $(NH_4)_2HPO_4$ gegen die entsprechende Menge $(NH_4)_2SO_4$ ausgetauscht.
Tatsächlich zeigte sich bei den hier durchgeführten Versuchen ein Optimum der Pentalenolacton-Bildung durch anorganisches Phosphat zwischen 10...12,5 mM, welches eine Steigerung der spezifischen Ausbeute auf das dreifache der durch die ursprünglich verwendeten Nährmedium-Zusammensetzung erzielten PL-Ausbeuten bewirkte (Abb. 20 und Abb. 24).

2.5.1.4 Optimierung der L-Asparagin-Konzentration

In folgender Test-Reihe wurden durch sinkende L-Asparagin-Konzentrationen (Stickstoff-Verarmung) versucht das Stickstoff/Kohlenstoff-Verhältnis zur Anregung erhöhter PL-Produktion zu verändern.
Ausgegangen wurde von einer L-Asparagin-Konzentration von 22 mM, die dem ursprünglichen Nährstoff-System zugrunde lag.
Hierbei kam es zu keiner Steigerung der PL-Ausbeute.
Die eingesetzte L-Asparagin-Konzentration von 15...22 mM war durchaus optimal (Abb. 21).
Der Einsatz einer anorganischen Stickstoff-Quelle, wie Kaliumnitrat wurde ebenfalls erprobt. Dies führte jedoch zu einer drastischen Einschränkung der gebildeten Biomasse und des Produktes Pentalenolacton bis auf Werte um 40%.

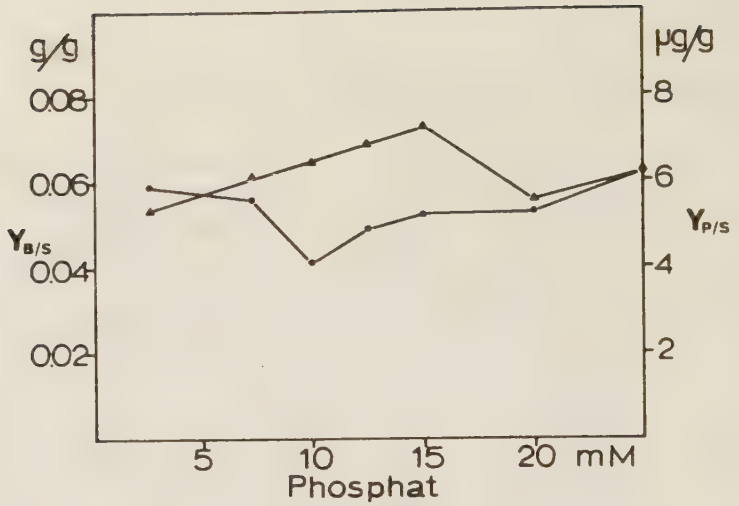


Abb. 20: Einfluß von anorganischem Phosphat (mM) auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (•——•) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▲——▲).

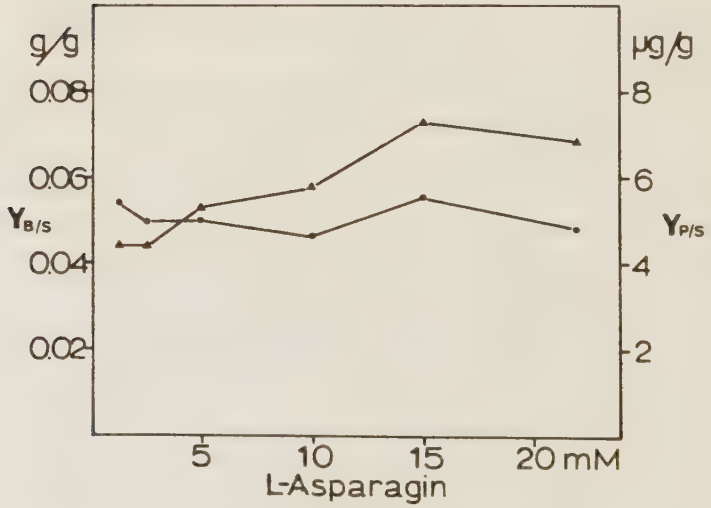


Abb. 21: Einfluß von L-Asparagin (mM) auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (•——•) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▲——▲).

2.5.1.5 Optimierung der Calcium-Konzentration

Im Zuge der von Maurer, K.-H. (72) durchgeführten Experimente zur Biosynthese des Sekundär-Metabolits Pentalenolacton erbrachten Hinweise auf den noch nicht eindeutig geklärten Zusammenhang von Calcium bei der Sporulation und dem Sekundär-Metabolismus von Mikroorganismen und führte zu Versuchen die Calcium-Konzentration im Nährmedium zu optimieren. Dabei sollte durch steigende Calcium-Konzentrationen eine erhöhte Sekundär-Metabolit-Ausschüttung stimuliert werden.
Auch diese Test-Reihe erbrachte,ähnlich wie die Phosphat-Optimierung,eine weitere drastische Erhöhung der PL-Ausbeute bei einem optimalen Calcium-Wert von 25...30 mM. Dies entsprach einer Ausbeute-Steigerung um das sechsfache der durch die ursprünglich verwendeten Nährmedium-Zusammensetzung erzielten PL-Ausbeuten (Abb. 22 und Abb.).
Einer optimalen Phosphat- und Calcium-Konzentration im Nährmedium kommen also entscheidende Bedeutung bei der Sekundär-Metabolit-Bildung im Fall des Mikroorganismus Streptomyces arenae Tü 469 zu.

2.5.1.6 Einsatz unterschiedlicher C-Quellen

Da bekannt war, daß die Pentalenolacton-Biosynthese über den Sesquiterpen-Weg verläuft (20, 21, 22, 23), wobei Polyole besonders gut verwertet werden, wurden 12 strukturell unterschiedliche C-Quellen aus 5 Stoffklassen (Aminosäuren, Polyole, Fettsäuren, Polysaccharide, Monocarbonsäuren) erprobt.
Hierbei erweist sich in Bezug auf die PL-Ausbeute L-Asparagin, L-Leucin und die chemostatisch wirkende Stearinsäure besonders günstig im Hinblick auf die ansonsten eingesetzte C-Quelle D-Mannit (Abb. 23).
Leider war im Fall der Stearinsäure aufgrund der Unlöslichkeit im Nährmedium keine exakte Trockengewichtsbestimmung möglich. Daher konnte keine

spezifische Ausbeute ($Y_{P/S}/Y_{B/S}$) bestimmt werden, die das Verhältnis Primär- zu Sekundär-Stoffwechsel aufgezeigt hätte.

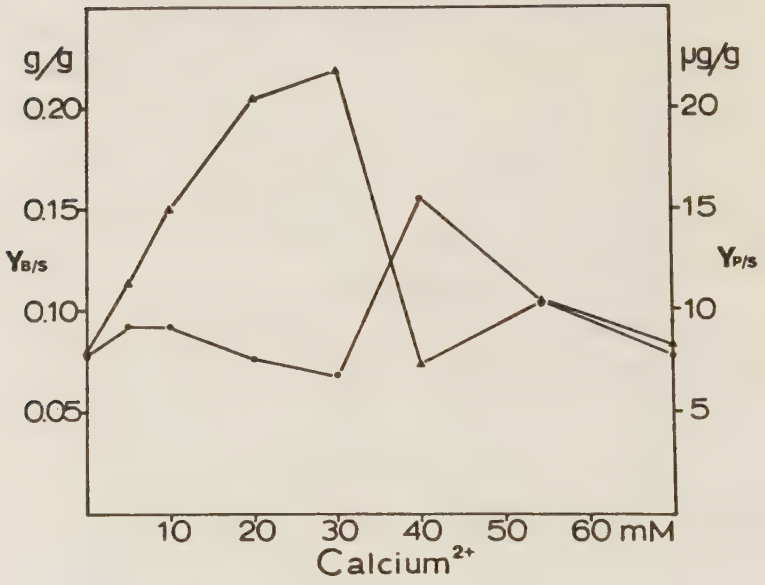


Abb. 22: Einfluß von Calcium^{2+} (mM) im Kultur-Medium auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (•——•) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▲——▲).

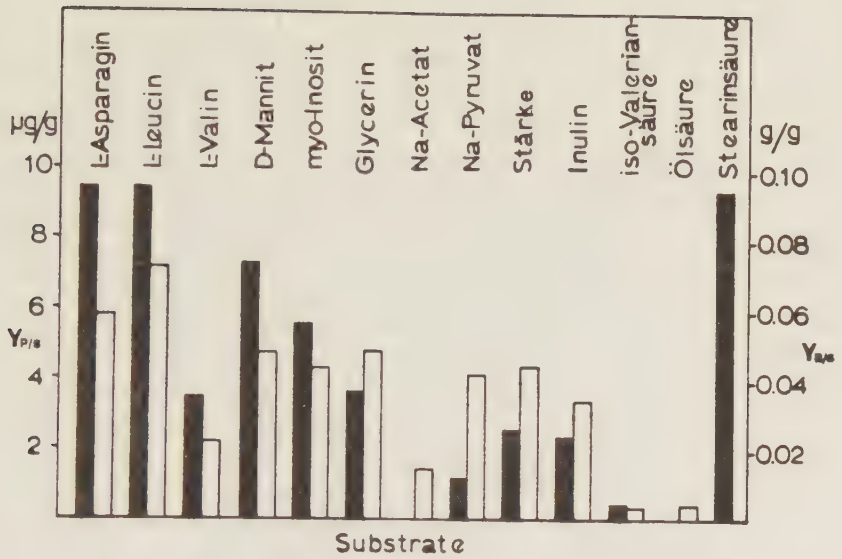


Abb. 23: Einfluß unterschiedlicher C-Quellen auf die Ausbeute an Biomasse ($Y_{B/S}$) (▭) und Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) (▬) im Kultur-Medium.

Anhand der spezifischen Ausbeute (Abb. 24) läßt sich zusammenfassend aus den Schüttelkolben-Experimenten der Nährmedium-Optimierung folgende optimale Nährstoff-Zusammensetzung für den Mikroorganismus Streptomyces arenae Tü 469 in Bezug auf seinen Sekundär-Metabolit Pentalenolacton erstellen, welche in die folgende Fermentationsoptimierung (scale up) eingesetzt wurde:

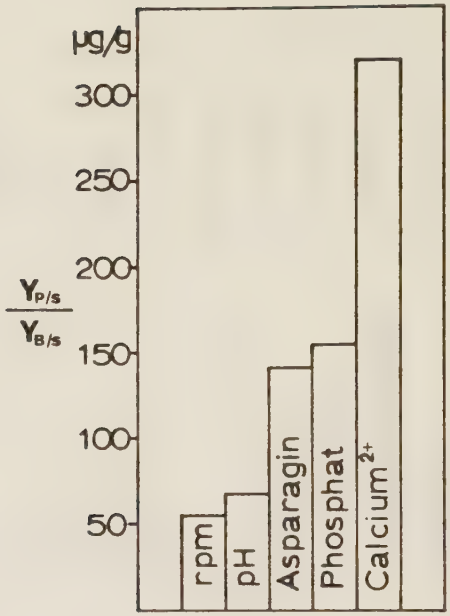


Abb. 24: Einfluß der unterschiedlichen Nährstoffe auf die spezifische Pentalenolacton-Ausbeute ($Y_{P/S}/Y_{B/S}$: produziertes Pentalenolacton ($Y_{P/S}$) zu gebildeter Biomasse ($Y_{B/S}$).

Nährstoffe:	Einwaage: bez. auf 1 Liter
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
NaCl	1 g
K_2HPO_4 x 3 H_2O	3 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	1 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	4 g
$FeSO_4$ x 7 H_2O	20 mg
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	10 mg
L-Asparagin	2,5 g
D-Mannit	40 g
	pH 6,3; 29°C

Tab. 9: Optimierte Nährstoff-Zusammensetzung des Mikroorganismus Streptomyces arenae Tü 469 in Bezug auf das Produkt Pentalenolacton.

2.5.2 Fermentation des Pentalenolacton-Produzenten Streptomyces arenae Tü 469

Aus der Vielzahl der durchgeführten Fermentationen nach Methode 1.5.2.2 im beschriebenen Fermenter-System (Abb. 1) zur Produktion des Sekundär-Metaboliten Pentalenolacton sowie beim vorhergegangenen scale up im halbtechnischen Maßstab (Produktionsfermenter: 4000 l) resultierte ein optimaler Fermentationsverlauf, wie er in Abb. 25 dargestellt ist (73).
Bei genauerer Betrachtung dieser Fermentationsverläufe zeigten sich zwei Auffälligkeiten, die in direktem Zusammenhang mit der PL-Produktion stehen und charakteristisch für Fermentationen von mycelbildenden Mikroorganismen sind.
Zum einen deuteten der parallele Verlauf der PL-Produktion (PL: mg/l) zum Streptomyceten-Wachstum (BTM: g/l) und das damit einhergehende Erreichen maximaler PL-Produktion im Kultur-Filtrat bei Beendigung der maximalen Wachstumsrate auf eine Limitierung durch die dem Mikroorganismus eigene Wachstumscharakteristik (Organismen-Konstante) hin, die sich letztendlich in einer charakteristischen Morphologie des Streptomyceten-Mycels bei optimaler PL-Produktion ausdrückt (74).
Eine Substrat-Limitierung durch die umgebenden Nährstoffe, wie die C-Quelle D-Mannit, die nach Beendigung der Fermentation noch zu 40% der Ausgangskonzentration (Bestimmung nach Methode 1.5.2.2.1) vorlag, noch die Sauerstoff-Konzentration (pO_2: %), wie Lehmann et al. (74) feststellten, wirkten auf die PL-Produktion limitierend.

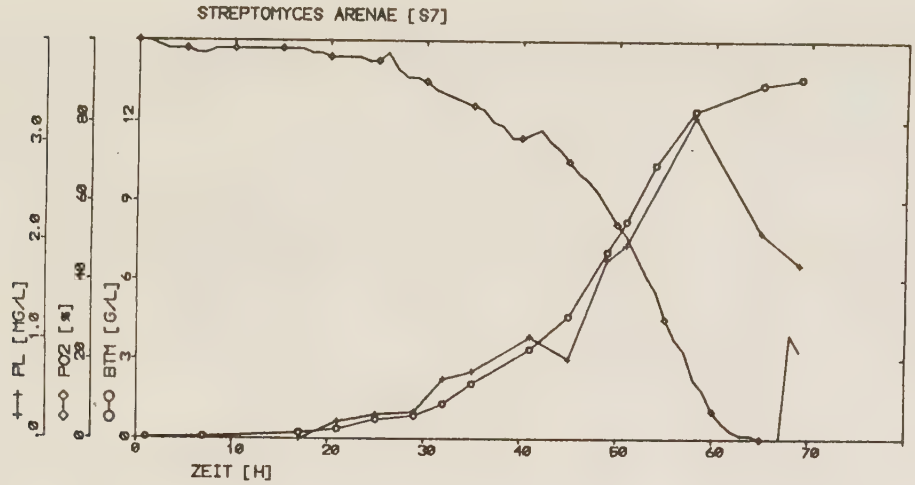


Abb. 25: Computer-kontrollierter Fermentationsprozeß von Streptomyces arenae Tü 469 zur Produktion von Pentalenolactone unter Referenz-Bedingungen (73).

Die zweite Auffälligkeit bei der Fermentation des mycelbildenden Bakteriums Streptomyces arenae Tü 469 betraf den sehr raschen Verlust an $GAPDH_{rm}$-hemm=aktiver Substanz innerhalb von 10 h um ca. 50%. Dieser rasche Abfall könnte auf einen enzymatischen Abbau des Sekundär-Metabolits Pentalenolacton hin=deuten. Vorversuche zu dieser Art Regulation wurden schon durchgeführt und gaben auch entsprechende Hinweise.

Wie aus diesen beiden Punkten in dem beschriebenen System zu ersehen ist, liegt eine Limitierung der PL-Produktion nicht so sehr in der Kontrolle seiner Umwelteinflüsse, wie Art und Konzentration der C- und N-Quelle, Sauerstoff-Gehalt, pH-Wert und Temp=eratur des Nährmediums begründet, als vielmehr in der genotypischen Kontrolle eines intra-zellulären Substrat-pool's.

Denn weder in den Fermentationen noch in den Schüttel=kolben-Kulturen konnte eine maximale Pentalenolacton-Konzentration von 3...4 mg/l Kultur-Filtrat über=schritten werden, sodaß eine signifikante Produktions=steigerung an Pentalenolacton nur über den Einfluß auf die Genetik des Streptomyceten Tü 469 zu erreichen sein wird.

2.6 Isolierung und Identifizierung von Pentalenolacton

Die nach Methode 1.5.2.3 mit anschließender präparativer HPLC (nach Methode 1.5.2.3.4) über den quantitativen Test nach 1.5.1.1.4 detektierten $GAPDH_{rm}$-hemmaktiven Substanzen aus dem Kulturfiltrat der Fermentationen konnten über die Methoden der chemischen Analysen nach 1.5.3 als fünf Pentalenolacton-Derivate isoliert werden (Abb. 26).
Als Reinheitskriterien für diese Pentalenolactone dienten das analytische HPLC-System nach Methode 1.5.2.3 (Abb. 27), das UV-Spektrum (Abb. 28), das IR-Spektrum (Abb. 29) sowie die ^{1}H-NMR-Spektren (Abb. 30, 31, 32, 33, 34).
Hierbei konnten die isolierten Pentalenolacton-Derivate als

Pentalenolacton H-Diol	: (PL_d-H:	t_R: 11 min),
Pentalenolacton F-Diol	: (PL_d-F:	t_R: 13 min),
Pentalenolacton-Epoxid	: (PL_e	t_R: 24 min),
Pentalensäure	: (PA	t_R: 26 min),
Pentalenolacton-Chlorhydrin	: (PL_c	t_R: 29 min)

identifiziert und charakterisiert werden (s. Kap. 2.7).
Den quantitativ größten Anteil im Kultur-Filtrat machte das Pentalenolacton-Chlorhydrin aus.

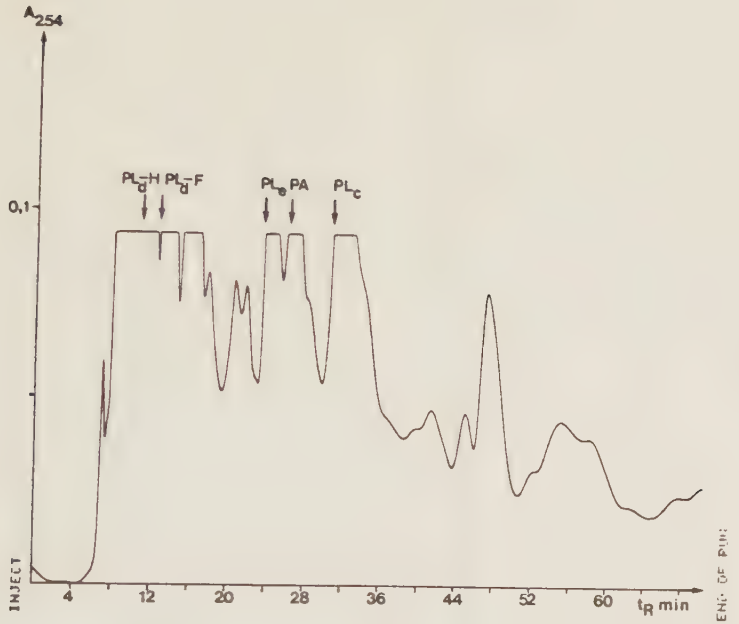


Abb. 26: Trennung und Isolierung von Pentalenolacton-Derivate aus dem Kultur-Filtrat der Fermentation durch präparative HPLC nach Methode 1.5.2.3.4.

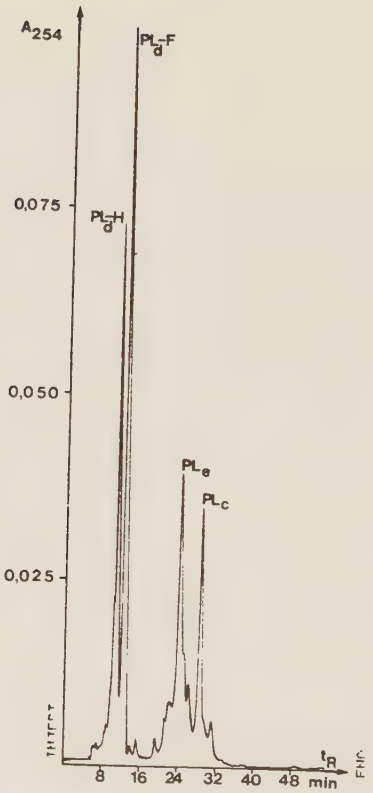


Abb. 27: Bestimmung des Reinheitsgrades und der Retentionszeit (t_R) rechromatographierter Pentalenolacton-Derivate durch analytische HPLC nach Methode 1.5.2.3.4.

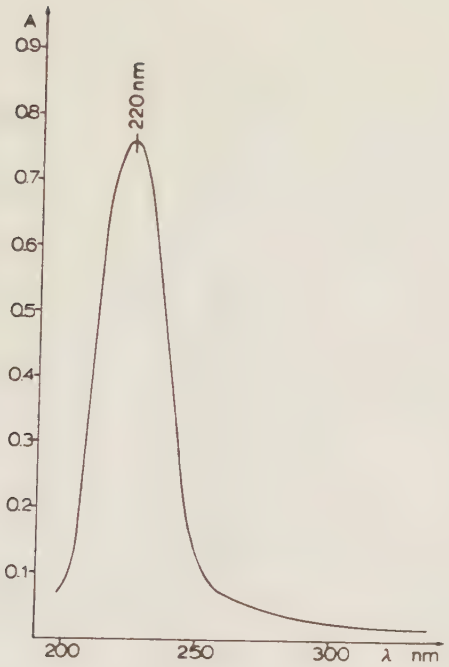


Abb. 28: UV-Spektrum der Pentalenolacton-Derivate PL_c, PL_e und PL_d-H (c: 10 µM; d: 1cm).

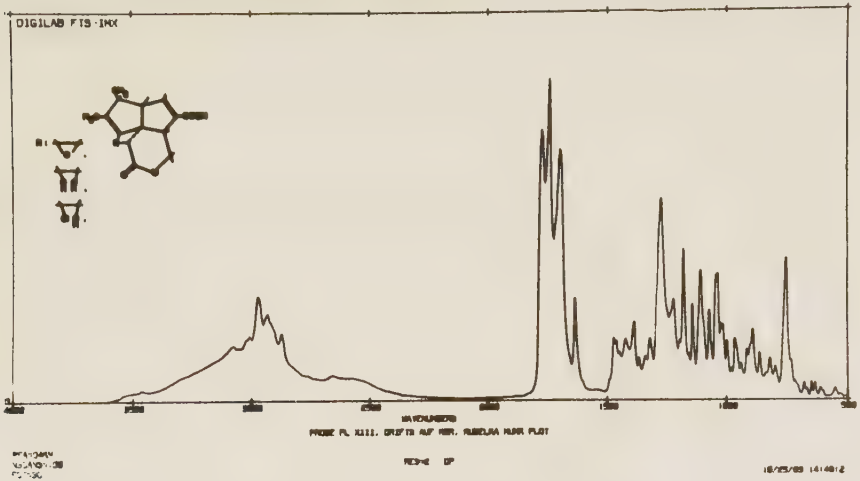


Abb. 29: IR-Spektrum der Pentalenolacton-Derivate PL_c, PL_e und PL_d-H auf KBr über einen Kubelka Munk Plot.

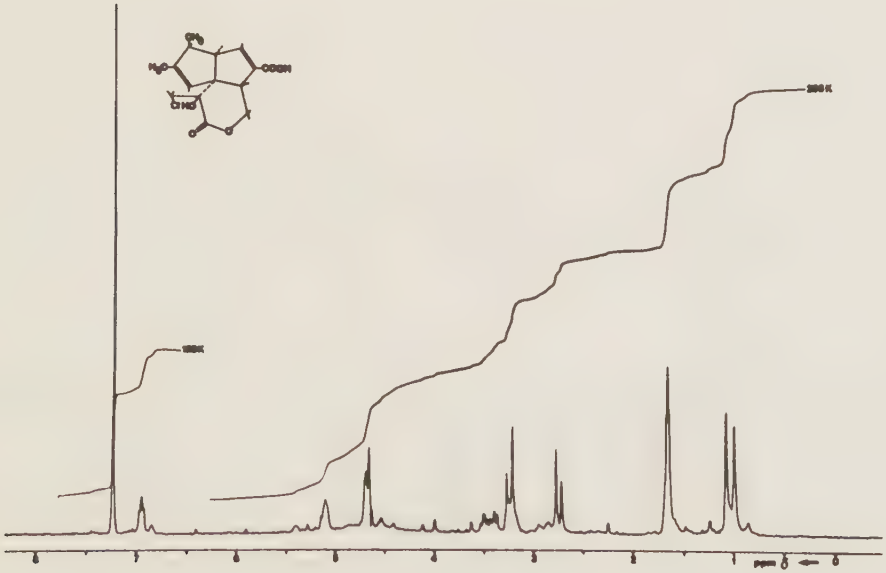


Abb. 30: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von Pentalenolacton-Chlorhydrin PL_c.

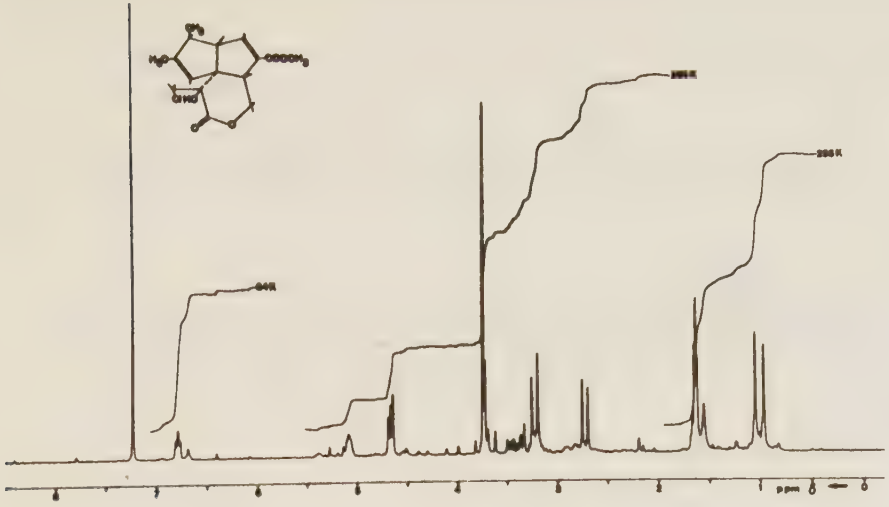


Abb. 31: ^{1}H-NMR- Spektrum (90 MHz) von Pentalenolacton-Chlorhydrin-Methylester.

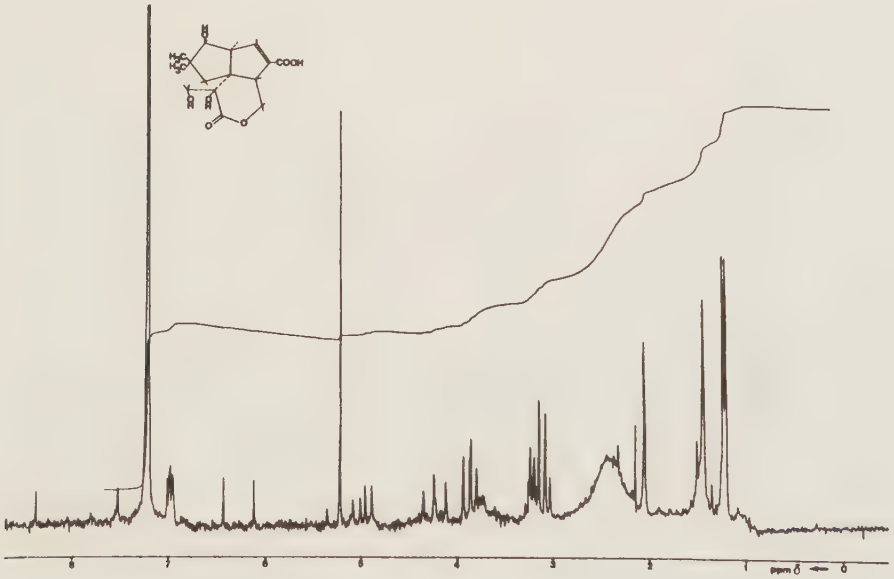


Abb. 32: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von Pentalenolacton-Diol F PL_d-F.

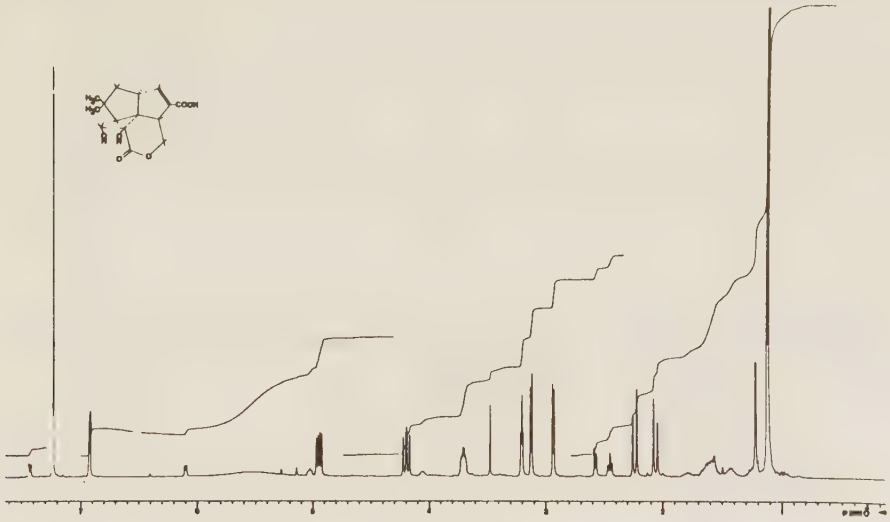


Abb. 33: ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Pentalenolacton-Diol H PL_d-H.

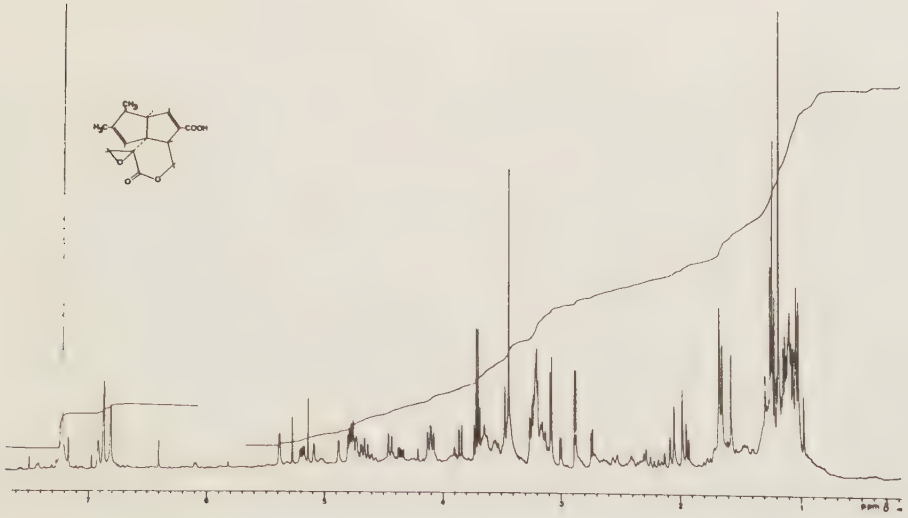
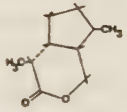
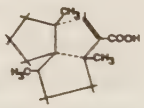
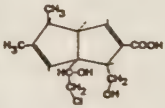
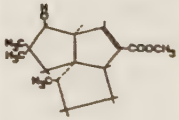


Abb. 34: ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Pentalenolacton-Epoxid PL_e.

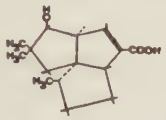
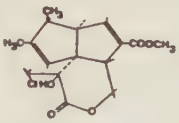
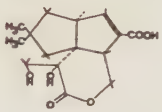
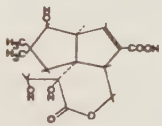
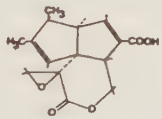
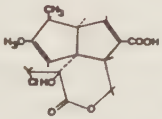
2.7.1 Bestimmung der relativen $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität von isolierten Pentalenolacton-Derivaten mit strukturell verwandten Verbindungen

Um den Einfluß bestimmter struktureller Merkmale der Pentalenolactone für eine GAPDH-Inhibition aufzuzeigen, wurden die fünf isolierten und identifizierten Pentalenolacton-Derivate mit den über chemische Synthesen nach Methode 1.5.4 dargestellten , strukturell verwandten Verbindungen wie Pentalenen, D,L-Isoiridomyrmecin, Isocomensäure sowie die Methylester dem quantitativen Test nach Methode 1.5.1.1.4 unterworfen und über die relative $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität (Methode 1.5.4.6) miteinander verglichen (Tab. 10).
Unter relativer $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität versteht man das Verhältnis der Konzentration des stöchiometrisch reagierenden PL_c-Derivates ($ID_{50,PLc}$; s. Kap. 2.2.2) zu der Konzentration der strukturell verwandten Verbindung, die nach 60 min Inkubation eine 50%ige Hemmung der $GAPDH_{rm}$ hervorruft ($ID_{50,X}$).
Hierbei zeigten sich mindestens zwei strukturelle Zentren innerhalb der Pentalenolacton-Struktur, die an der Inhibition der GAPDH beteiligt sind.
Zum einen dürfte die α,ß-ungesäätigte Carbonsäure bei der Bindung des Inhibitors an seinen Wirkort notwendig sein, was durch Vergleich von PL_c zu seinem Methylester (Faktor 1000 schwächer) erkennbar war. Ebenso zeigte sich die Wichtigkeit dieses Struktur-Elementes auch bei dem Vergleich von Pentalensäure zu seinem Methylester.
Das zweite wichtige Struktur-Element dürfte, die am Lacton-Ring befindliche, jedoch in der Struktur variabele Gruppe sein, welche Epoxid-, Chlorhydrin-, α-Methylen (17)- und Diol-Gruppen umfassen kann. Dies war erkenntlich an der relativ schwachen $GAPDH_{rm}$-Hemmwirkung des Pentalenolacton F-Diol (Faktor 100 schwächer) gegenüber dem Epoxid- und Chlorhydrin-Derivat.

Durch eine Hydroxyl-Gruppe in Position C-1 des PL_d-H-Diol trat eine Verstärkung in der $GAPDH_{rm}$-Hemmwirkung auf, was eventuell auf ein drittes Zentrum für die Pentalenolacton-Bindung hindeutet (Faktor 20 schwächer).
Nur eine unbedeutende Rolle bei der $GAPDH_{rm}$-Hemmung dürfte der Lacton-Ring spielen, da Pentalensäure und das 7,8 Dimethyl-5-(α-Hydroxy-ß-Chlorethyl)-6-Bicyclo[3.3.0]-Octadien-(2.6)-3-Carbonsäure-Derivat, die keinen Lacton-Ring aufweisen, durch aus hemmaktiv waren, wogegen der Ameisen-Abwehrstoff D,L-Isoirido=myrmecin mit beschriebenen antibiotischen Eigenschaften keinerlei $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität zeigte.
Ebenfalls keine Hemm-Wirkung zeigte, wie zu erwarten, das reine Kohlenstoff-Gerüst des Pentalenen.
Das Ausbleiben der $GAPDH_{rm}$-Hemmung des Pflanzen-Sesquiterpen-Lactons Isocomensäure war überraschend, da aufgrund einer α,ß-ungesättigten Carbonsäure und des ähnlichen Kohlenstoff-Gerüstes in Hinblick auf die Pentalensäure-Struktur eine Inhibition zu er=warten war. Jedoch zeigte sich im Vergleich der Struktur-Modelle von Pentalensäure zu Isocomensäure eine Spiegebild-Isomerie, also enantiomeres Verhalten, sodaß ein Ausfall der $GAPDH_{rm}$-Hemmung trotz gleicher und für die Bindung essentieller Struktur-Elemente erklärbar wurde. Damit war neben den notwendigen funktionellen Gruppen auch eine entsprechende Kon=formation notwendig, die aus einer cis-Stellung des Lacton-Ringes resultierte, sodaß ein Zueinanderpassen der Struktur-Elemente von Pentalenolacton zu reaktiven Aminosäure-Resten innerhalb der $GAPDH_{rm}$-Konformation erforderlich war.

Name	Struktur	rel. Hemm-Aktivität	Darstellung	Ref.
Pentalenen		0	chem. synth.	14, 59
D,L-Isoiridomyrmecin		0	chem. synth.	63
Isocomensäure		0	biochemisch synth.	60
7,8 Dimethyl-5-(α-Hydroxy-ß-Chlorethyl)-6-Bicyclo [3.3.0] - Octadien-(2.6)-3-Carbonsäure		2×10^{-5}	chem. mod.	10, 65
Pentalensäure-Methylester		5×10^{-5}	chem. mod.	15, 64

Tab. 10: Relative $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität in Abhängigkeit von Struktur-Elementen Pentalenolacton-verwandter Verbindungen (rel. Hemmaktivität = $ID_{50, PLc}$: $ID_{50,X}$).

Name	Struktur	rel. Hemm-Aktivität	Darstellung	Ref.
Pentalensäure		1×10^{-4}	biochemisch synth.	15,21
Pentalenolacton-Chlorhydrin-Methylester		1×10^{-3}	chem. mod.	11,64
Pentalenolacton F-Diol		1×10^{-2}	biochemisch synth.	5
Pentalenolacton H-Diol		2×10^{-1}	biochemisch synth.	5
Pentalenolacton-Epoxid		1	biochemisch synth.	7
Pentalenolacton-Chlorhydrin		1	biochemisch synth.	11

Tab. 10: Relative $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivität in Abhängigkeit von Struktur-Elementen Pentalenolacton- verwandter Verbindungen (rel. Hemmaktivität = $ID_{50, PLc}$: $ID_{50, X}$).

2.7.2 Experimente zum reaktiven Verhalten der Pentalenolacton-Derivate PL_d-F und PL_c bei der $GAPDH_{rm}$-Inhibition

Die hier durchgeführten Experimente nach Methode 1.5.1.3.2 sollten die Stärke und Kinetik der Reaktion zwischen $GAPDH_{rm}$ und den Pentalenolacton-Derivaten PL_d-F und PL_c aufzeigen.
Hierzu wurden PL_c- und PL_d-F-modifizierte $GAPDH_{rm}$-Präparate mit nicht vollständigem Inhibitionsgrad 2 h bei 20°C unter verschiedenen ATP-Konzentrationen (mM) inaktiviert und anschließend die spezifische $GAPDH_{rm}$-Aktivität (U/mg) in den Inkubationsansätzen bestimmt (Abb. 35).

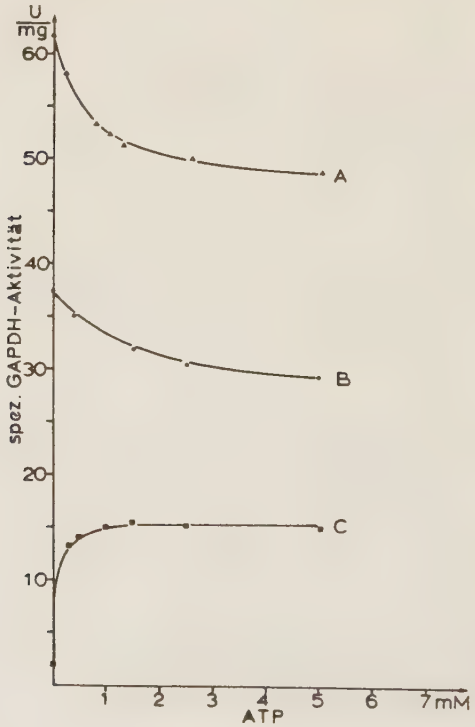


Abb. 35: Konzentrationsabhängiger Einfluß von ATP (mM) auf den Inhibitionsgrad (U/mg) von $GAPDH_{rm}$ (A), PL_c-behandelter (B) u. PL_d-H-behandelter GAPDH (C).

Es zeigte sich bei dem PL_c-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparat (Kurve B) ein, der Kontrolle (Kurve A) vergleichbarer Verlust an enzymatischer Aktivität, der auf dem regulatorischen Einfluß von ATP über eine Änderung der $GAPDH_{rm}$-Konformation (53) beruhte. Dagegen trat bei dem Einsatz von PL_d-F-modifizierter $GAPDH_{rm}$ eine Aktivierung des inhibierten $GAPDH_{rm}$-Präparates von 2,0 U/mg auf 15 U/mg ein.
Dieser Effekt von ATP bei PL_d-F-inhibierter $GAPDH_{rm}$ könnte auf eine durch Konformationsänderung hervorgerufene Destabilisierung der für die Inhibition durch Pentalenolacton notwendigen Bindungen zurückzuführen sein.
So schien, durch die ATP-induzierte Konformationsänderung, eine optimale Bindungsposition für eine $GAPDH_{rm}$-Hemmung durch das Diol-Derivat nicht mehr gegeben zu sein, sodaß möglicherweise PL_d-F nur über das Struktur-Element der α,β-ungesättigten Carbonsäure die Inhibitor-Wirkung ausübte.
Hierbei könnte dem elektronegativen Charakter, der an dem Lacton-Ring befindlichen Gruppe, eine besondere Bedeutung für eine irreversibele $GAPDH_{rm}$-Hemmung zukommen. Dieser elektronegative Charakter ist bei dem Chlorhydrin- und Epoxid-Derivat (s. 2.7.1) stärker ausgeprägt als bei dem Diol-Derivat.
Ein zweiter Versuch, der die unterschiedliche Reaktivität von PL_c und PL_d-F auf $GAPDH_{rm}$ aufzeigte, bestand in dem zeitlichen Ablauf dieser Reaktion, wie in Abb. 36 dargestellt ist.
Hierzu wurden ein 2500facher molarer Überschuß der Inhibitoren zu $GAPDH_{rm}$ eingesetzt.
Die aufgenommene Kinetik zeigte einen drastischen Unterschied in der Reaktivität von PL_c zu PL_d-F mit dem Enzym $GAPDH_{rm}$. Das Diol-Derivat wies nach 50 min Reaktionsdauer noch eine Restaktivität von 5% auf, wogegen das Chlorhydrin-Derivat nach 1,5 min schon vollständig gehemmt war.

Dieses Ergebnis drückt die Reaktivität der am Lacton-Ring befindlichen Gruppe aus, die im Fall des Diol-Derivates deutlich schwächer ausgeprägt war, als bei dem Chlorhydrin-Derivat.
Inwieweit über die durchgeführten Experimente Hinweise für eine mögliche Reversibilität der Inhibitor-Wirkung von PL_d-F bei $GAPDH_{rm}$ gegeben waren, konnte dahingehend ausgeschlossen werden, daß die Bindung der α,β-ungesättigten Carbonsäure-Gruppierung als zweites reaktives Zentrum (s. 2.7.1) ausreichte, eine Hemm-Wirkung bei $GAPDH_{rm}$ durchzuführen und aufrechtzuerhalten.
Dies war erkennbar daran, daß zum einen eine vollständige Aktivierung des PL_d-F-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparates durch ATP nicht gelang. Zum anderen erbrachte eine Dialyse eines PL_d-F-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparates keine Aktivierung des Enzyms, was auf eine Abspaltung des Inhibitors PL_d-F hingewiesen hätte.

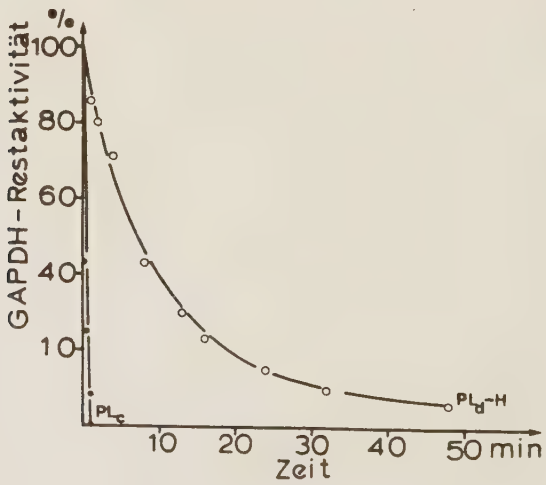


Abb. 36: Zeitabhängige Hemmwirkung der Pentalenolacton-Derivate PL_c und PL_d-H auf $GAPDH_{rm}$.

3.0 Diskussion

Die Frage, inwieweit sich der vom Actinomyceten Streptomyces arenae produzierte Sekundär-Metabolit Pentalenolacton als irreversibeler GAPDH-Inhibitor im Hinblick auf Wirkungsmechanismus, Enzym-Spezifität und Bindungsstelle von der Vielzahl der durch Pflanzen produzierten Sesquiterpen-Lactone(26, 27) unterscheidet, kann anhand drei unterschiedlicher methodischer Ansätze beantwortet werden.

3.1 Bestimmung der Enzym-Spezifität und Bindungsposition bei $GAPDH_{rm}$ von Pentalenolacton-Chlorhydrin

Die schon von Hartmann, S. (29) durch kinetische Daten postulierte Irreversibilität der Bindung von Pentalenolacton an $GAPDH_{rm}$ kann durch weitere Experimente gestützt werden.
Unter verschiedenen physikochemischen Bedingungen, (s. 2.1) wie $GAPDH_{rm}$-Denaturierung mit anschließender Renaturierung, pH-Wert-Einflüsse sowie elektrische Kräfte, ist eine Abspaltung des Inhibitors von seinem Wirkort $GAPDH_{rm}$ nicht möglich. Vielmehr ergibt sich über die Gleichgewichtsdialyse (s. 2.1.2) der Hinweis auf eine stöchiometrisch verlaufende Reaktion. Stöchiometrie und hohe Bindungsfestigkeit erlaubten daher von einer irreversibelen Bindung eventuell in Form einer kovalenten Bindung zwischen Inhibitor und Enzym auszugehen.
Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich eine Titration einer bekannten $GAPDH_{rm}$-Menge mit einer bekannten PL_c-Menge durchzuführen (s. 2.2.2), die zum einen ein molares Reaktionsverhältnis von 4 Mole PL_c zu 1 Mol $GAPDH_{rm}$ bestätigt und somit eindeutig mit dem Aufbau der $GAPDH_{rm}$ aus vier identischen Untereinheiten korreliert (34).

Zum anderen ist über eine Eichkurve ein quantitatives Test-System für eine PL_c-Bestimmung (s. 2.2.1) gegeben, das geeignet ist, die Produkt-Bildung in den Schüttel=kolben-Kulturen und Fermentationen des PL-Produzenten Streptomyces arenae zu kontrollieren (s. 2.5).
Anhand der Aktivitätsbestimmungen ist bei einer Viel=zahl von Enzymen unter PL_c-Einfluß (s. 2.3.1) keine Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität durch den Inhibitor nachzuweisen. Weder Enzyme, deren Substrate strukturelle Ähnlichkeit zu dem Substrat D-GAP auf=weisen, noch die Enzyme, die NAD als Cosubstrat be=nötigen und vorwiegend "SH-Enzyme" darstellen, sind durch PL_c hemmbar. Damit wird das getestete Enzym-Spektrum über den Bereich der Glykolyse-Enzyme (13) hinaus erweitert und zeigt die außergewöhnlich hohe Enzym-Spezifität des Glykolyse-Inhibitors Pental=enolacton.
So sind durch die Inhibitor-Wirkung von PL_c ausschließ=lich GAPDH's unterschiedlicher Species betroffen, deren Sensitivität gegenüber dem Inhibitor PL_c je nach Coenzym-(NAD-)Bindung von Kaninchenmuskel-GAPDH über E.coli-GAPDH zu Hefe-GAPDH abnimmt (Abb. 8). Hierbei kann dem Coenzym NAD ein kooperativer Einfluß auf die Inhibitor-Wirkung von PL_c bei GAPDH's unterschiedlicher Species zuge=sprochen werden.
Diese Ergebnisse werden auch durch die Arbeiten von Mann,K.-H. et al. (67) bestätigt, die ebenfalls eine Abnahme der Sensitivität auf Pentalenolacton von NAD-spezifischer GAPDH (EC 1.2.1.12) über NAD-(NADP-)spezi=fischer GAPDH (EC 1.2.1.13) zu NADP-spezifischer GAPDH (EC 1.2.1.9) zeigten.
Interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Maurer, K.-H. et al. (25), der zwei Isoenzyme in Form einer PL-sensitiven und PL-insensitiven GAPDH aus dem PL-Produzenten Streptomyces arenae isolieren konnte. Die Grundlage für die PL-Insensitivität des isolierten Isoenzyms konnte noch nicht aufgeklärt werden.

Zur Erklärung des kooperativen Effektes durch das Coenzym NAD sind zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnte bei den getesten GAPDH's eine, durch NAD-induzierte, günstige Konformation die Bindung des Inhibitors PL_c erleichtern, wobei die für die Enzym-Katalyse exakt ausgerichtete NAD-Position innerhalb der GAPDH-Struktur gestört ist. Die andere Möglichkeit, die mit obiger Erklärung einhergehen könnte, bestände in einer Wechselwirkung des positiv geladenen Nicotin-amid-Ringes mit elektronegativen Struktur-Elementen des Pentalenolacton.
Eine direkte Wechselwirkung zwischen NAD und PL_c, eventuell in Form einer kovalenten Bindung, kann ausgeschlossen werden, da die Inhibitor-Wirkung von PL_c bei unterschied-licher Beladung des Enzyms $GAPDH_{rm}$ mit NAD (36) unab-hängig von der Menge an gebundenem NAD auftritt (s. 2.3.2).

Die aus den Ergebnissen resultierende hohe Enzym-Spezifität für eine Inhibitor-Reaktion durch PL_c, deutet auf eine, für die katalytische Aktivität von GAPDH's, charakteris-tische und essentielle Aminosäure-Sequenz hin.
Zur Identifizierung, der für die Pentalenolacton-Bindung notwendigen Aminosäure-Position innerhalb der $GAPDH_{rm}$, wurden Modifizierungsexperimente (s. 2.4) bei nativer PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ durchgeführt, die eine Bestimmung von reaktiven Cystein-Resten (s. 2.4.1), Lysin-Resten (s. 2.4.2) und Arginin-Resten (s. 2.4.3) ermöglichten. Weder bei den SH-Gruppen-Bestimmungen reaktiver Cystein-Reste, noch bei der Bestimmung von reaktiven Lysin-Resten, konnte eine signifikante Differenz von 4 PL_c-modifizierten Aminosäure-Resten bei nativer zu PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ festgestellt werden, die mit der Stöchiometrie der Inhibi-tor/Enzym-Reaktion von 4 Mole PL_c zu 1 Mol $GAPDH_{rm}$ korreliert hätte (s. 2.2.2). Dies gilt auch für die in apo-$GAPDH_{rm}$ gesondert bestimmten reaktiven SH-Gruppe des Cystein-Restes in Position 149 (s. Abb.17), die wie in (34)

beschrieben, ein für die Enzym-Katalyse essentieller Aminosäure-Rest darstellt, der in einer konzertierten Aktion mit dem Coenzym NAD den Hydrid-Transfer bei gleichzeitiger Substrat-Bindung vollzieht.
Eine gewisse Differenz von 2 SH-Gruppen pro 1 Mol $GAPDH_{rm}$ bei der Bestimmung des Cystein-Restes 149 mittels Ellmann's Reagenz, wie sie in Abb.10 darge= stellt ist, dürfte aus einer sterischen Hinderung der DTNB-Reaktion aufgrund des irreversibel gebundenen, voluminösen PL_c-Moleküls resultieren. Bei der SH-Gruppen-Bestimmung von Cystein-149 durch p-HMB tritt diese Hinderung nicht auf und sämtliche 4 Cystein-Reste, der aus 4 identischen Untereinheiten bestehenden $GAPDH_{rm}$, sind in der nativen wie PL_c-behandelten Enzym-Form modifizierbar.
Ebenso steht einer reaktiven SH-Gruppe als eventuelle Pentalenolacton-Bindungsstelle innerhalb der $GAPDH_{rm}$ entgegen, daß weder unter Einfluß von Cystein, noch mit dem im enzymatischen Test (s. 2.2.1) befindlichen 2-Mercaptoäthanol über eine Wechselwirkung mit PL_c eine Beeinträchtigung der Inhibitor-Wirkung bei $GAPDH_{rm}$ erfolgt.
Hier steht der vom Actinomyceten Streptomyces arenae synthetisierte Sekundär-Metabolit Pentalenolacton im Gegensatz zu den von Pflanzen gebildeten Sesquiterpen-Lactonen, die Einfluß auf die Aktivität unterschiedlicher Enzyme im Stoffwechsel nehmen (75, 76, 77) und über eine Blockierung durch nucleophilen Angriff reaktiver Cystein-Reste als Enzym-Inhibitoren wirken (75, 78, 79). So konnten diese Enzym-Inhibitoren mit Cystein, Glutathion oder n-Propyl-Thiol zur Reaktion gebracht werden, die zu stabilen, isolierbaren Addukten führten (26, 75, 77).

Neben der Bestimmung der gesamten Anzahl an freien ε-Amino-Gruppen mittels TNBS bei nativer und PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$, die neben Lysin auch Arginin erfaßt, ist auch eine Bestimmung der reaktiven Lysin-Reste in Aminosäuresequenz-Position 191 und 212 (s. Abb.17) mittels PALP möglich.
Hierbei kommt dem Lysin-Rest 191 als Phosphat-Bindungsstelle (o.a. Arsenat) bei der Enzym-Katalyse besondere Bedeutung zukommt (48). Dagegen zeigt Lysin-183 keine Reaktion mit PALP, da eine Beteiligung an der Coenzym-(NAD-)Bindung diese Aminosäure vor dem Angriff durch Modifizierungsreagentien schützt (80). Insgesamt können durch PALP drei reaktive Lysin-Reste innerhalb der $GAPDH_{rm}$ nachgewiesen werden, wobei der dritte Lysin-Rest der Aminosäuresequenz-Position 2 zugeordnet werden konnte (48).
Ebenso wie bei den SH-Gruppen-Bestimmungen ist keine Differenz in der Anzahl freier ε-Amino-Gruppen der beschriebenen Lysin-Reste bei nativer wie auch PL_c-behandelter $GAPDH_{rm}$ zu beobachten, sodaß man, mit Einschränkung von Lysin-Rest 183, eine Beteiligung von Lysin-Resten bei der irreversibelen Bindung des Inhibitors PL_c ausschließen kann.
Bei der Modifizierung der Substrat-Bindungsstelle von $GAPDH_{rm}$ mittels Methylglyoxal , an welcher der reaktive Arginin-Rest in der Aminosäuresequenz-Position 231 (s. Abb.17) beteiligt sein soll (52), kann ein kompetitiver Einfluß von Methylglyoxal auf den Inhibitionsgrad durch PL_c beobachtet werden. Bei gleichzeitiger Zugabe von Methylglyoxal und PL_c tritt eine von der Methylglyoxal-Konzentration abhängige Erhöhung der $GAPDH_{rm}$-Restaktivität auf (s. Abb.12). Bei vorheriger Inkubation des Enzyms mit PL_c findet der kompetitive Effekt nicht mehr statt, da die hohe Bindungsstärke des Inhibitors überwiegt und eine Verdrängung durch Methylglyoxal nicht mehr stattfinden kann.

Dieser Hinweis der Beteiligung der Substrat-Bindungsstelle von $GAPDH_{rm}$ bei der Bindung des Inhibitors PL_c über einen reaktiven Arginin-Rest als Erkennungsstelle anionischer Molekül-Strukturen (51), zeigt sich ebenfalls bei dem Ausfall der $GAPDH_{rm}$-Inhibition durch PL_c bei vorheriger Zugabe des natürlichen Substrates D-GAP. Bei dieser Versuchsanordnung kann ein "normaler" Verlauf der Enzym-Katalyse beobachtet werden.
Weitere Evidenz einer Interaktion von PL_c mit Arginin-Resten innerhalb des katalytischen Zentrums der $GAPDH_{rm}$ drückt sich in der proteolyse-induzierenden Wirkung von PL_c bei der Enzym-Hydrolyse durch die arginin-spezifische Protease Clostripain aus. Hierbei kann eine durch NAD hervorgerufene Schutzwirkung eines reaktiven Arginin-Restes im katalytischen Zentrum von $GAPDH_{rm}$ durch den Inhibitor PL_c aufgehoben werden (s. Abb.13 u. Abb.14). Eine schützende Wirkung durch das Coenzym NAD wird ebenfalls bei dem Lysin-Rest 183 und Cystein-Rest 149 beobachtet. Beide Aminosäure-Reste sind essentiell für die katalytische Aktivität der $GAPDH_{rm}$ (28).
Zu erklären ist die proteolyse-induzierende Wirkung von PL_c durch eine Verdrängung des Coenzyms NAD aus dem Bereich des in Nachbarschaft befindlichen, reaktiven Arginin-Restes (evt. Arginin-231), der dadurch der hydrolytischen Aktivität der Protease Clostripain zugänglich gemacht wird. Dies steht auch im Einklang mit dem beobachteten kooperativen Effekt von NAD auf die Hemm-Wirkung von PL_c bei GAPDH's unterschiedlicher Species (s. Abb. 8).
Alle drei Experimente demonstrieren einen Einfluß eines reaktiven Arginin-Restes im katalytischen Zentrum von $GAPDH_{rm}$ und eine eventuelle Interaktion mit dem Inhibitor PL_c. Die Interaktion zwischen dem reaktiven Arginin-Rest und dem Inhibitor beruht dabei nicht auf einer kovalenten Bindung, sondern wahrscheinlich auf einer über Nebenvalenzen basierenden ionischen Wechselwirkung.

Die Methode (s. 2.4.4) der Modifizierung von $GAPDH_{rm}$ mit tritiummarkiertem PL_c und anschließender Trypsinolyse führte über das HPLC-System zur Isolierung einer, über die Ergebnisse der Enzym-Spezifität (s. 2.3.1) postulierten, phylogenetisch konservativen und für GAPDH's charakteristischen Teilsequenz.
Das isolierte Peptid umfaßt, nach automatischer Aminosäure-Analyse und Vergleich mit der bekannten Aminosäure-Sequenz von Muskel-GAPDH (s. Abb.17), die Aminosäure-Sequenz-Positionen 160-183. Innerhalb dieser Teilsequenz befinden sich neben zwei weiteren Histidin-Resten, ein für die katalytische Aktivität essentieller und reaktiver Histidin-Rest in Position 176 (70), der als nucleophile Angriffsposition unter Bildung einer kovalenten und somit irreversibelen Bindung zwischen $GAPDH_{rm}$ und dem Inhibitor PL_c dienen kann. Versuche kovalent verbundene Histidin/PL_c-Addukte zu isolieren, sind in Vorbereitung.
Damit resultierte eine Bindungsposition des Inhibitors Pentalenolacton-Chlorhydrin innerhalb einer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen charakteristischen Teilsequenz, die für die Enzym-Katalyse essentielle Aminosäuren betrifft (81) und deren Blockierung durch den Inhibitor eine irreversibele Hemmung des Enzyms hervorruft. Ebenso erklärt die charakterisierte Bindungsposition die außergewöhnlich hohe Enzym-Spezifität des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton und der damit eine Sonderstellung gegenüber den von Pflanzen synthetisierten Sesquiterpen-Lactone einnimmt.

3.2 Fermentative Produktion und Isolierung des Sekundär-Metabolits Pentalenolacton

Abgesehen von dem Einfluß, den Fermenter-Ausstattung und Fermenter-Design auf die Produktivität von bestimmten Metaboliten oder Biomasse ausüben, bleibt der Fermenter nur ein Instrument zur Überwachung des Zustandes des Nährmediums. Letztendlich ist es der Zustand des Mediums (pH-Wert, Temperatur, Belüftung, qualitative und quantitative Zusammensetzung der Nährstoffe) der das Wachstum von Mikroorganismen beeinflußt, wobei der Einsatz eines Minimal-Mediums zur Auffindung von Antimetaboliten von Vorteil ist (4).

Zu einem Aspekt vorliegender Arbeit wurde es daher, auf der Basis der getesteten Prozeß-Parameter (s. 2.5), eine optimale Nährstoff-Zusammensetzung für den Mikroorganismus Streptomyces arenae Tü 469 zugunsten eines erhöhten Sekundär-Metabolismus zu ermitteln.

Die Optimierung dieser Parameter ist der entscheidende Ansatz inwieweit man den Primär-Stoffwechsel (Ausbeute an gebildeter Biomasse) in Richtung des Sekundär-Stoffwechsels (Ausbeute an gebildetem Pentalenolacton) zurückdrängen kann, ohne die Lebensfähigkeit des Mikroorganismus zu gefährden. Das Verhältnis Primär- zu Sekundär-Stoffwechsel kommt in dem Begriff der spezifischen Ausbeute ($Y_{P/S}/Y_{B/S}$, s. Abb.24) zum Ausdruck und zeigt anschaulich den Einfluß der getesteten Parameter auf die Pentalenolacton-Bildung, wobei einer optimalen Phosphat- und Calcium-Konzentration im Nährmedium besondere Bedeutung zukommen.

Primär- und Sekundär-Stoffwechsel können jedoch nicht unabhängig voneinander gesehen werden, sondern sind komplementierende Alternativen, wobei zumindest der Sekundär-Stoffwechsel einer Gesamt-Regulation über den Primär-Stoffwechsel unterworfen ist, zu erkennen daran, daß beide Stoffwechselwege um Schlüssel-Intermediate wie z.B. Acetyl-CoA konkurrieren und daher mit dem Mikroorganismen-Wachstum korreliert sind (82).

Die Korrelation, daß sich Wachstum und Sekundär-Metabolismus nicht gegenseitig ausschließen müssen, zeigt sich anhand des Fermentationsverlaufes in Abb.25. Jedoch muß Wachstum bei mycelbildenden Mikroorganismen anders definiert werden, wie Wachstum bei Bakterien oder Hefen.

Eine maximale Wachstumsrate wird bei mycelbildenden Bakterien wie dem vorliegenden Streptomyceten dadurch bestimmt, daß

1. das Längenwachstum der Spitze kurzer Hyphen sowohl proportional der Hyphenlänge wie zur Wachstumsrate ist, d.h. daß kurze Hyphen exponentiell wachsen;
2. jede Hyphe eine Zuwachsrate aufweist, die sich zwischen einem minimalen und einem maximalen Wert bewegt, wobei letzterer die dem Organismus eigene spezifische Organismen-Konstante ausmacht und
3. sobald die Kapazität für das Längenwachstum der bestehenden Hyphenspitze überschritten wird, eine neue Verzweigung entsteht (83).

Aus allen drei Punkten resultiert über eine geeignete fermentative Prozeß-Führung eine, für die optimale PL-Produktion charakteristische Morphologie des Streptomyceten-Mycels (74), wobei intrazellulär nach Beendigung der maximalen Wachstumsrate ein Ungleichgewicht im Organismen-Wachstum eintritt. Nährstoffe, die im Medium in ausreichender Konzentration vorliegen, können in Stoffwechselwege eingeschleust werden, die für das Wachstum nicht mehr essentiell sind. Welcher dieser sekundären Stoffwechselwege aktiv wird, ist sowohl vom Organismus (Genotyp) wie von der Art des limitierenden Substrates abhängig (84).

Aus allgemeinen Beobachtungen kann man schließen, daß die gesamte Kinetik des Primär-Stoffwechsels durch den Substrat-Level reguliert wird, da die Enzyme normalerweise im Überschuß vorliegen, wohingegen der Sekundär-Metabolismus größtenteils enzymlimitiert ist (82).
Unter diesem Gesichtspunkt ist auch eine Limitierung der Pentalenolacton-Biosynthese durch den pool eines bestimmten, noch nicht identifizierten, Metaboliten zu sehen, welcher wachstumskontrolliert ist und um den die verschiedenen Stoffwechselwege konkurrieren. Eine Limitierung der PL-Produktion ist daher nicht so sehr durch die Kontrolle seiner Umwelteinflüsse wie Art und Konzentration der C- und N-Quelle, pH-Wert, Sauerstoff-Gehalt des Nährmediums bedingt (wenn auch Calcium- und Phosphat-Konzentration besondere Bedeutung zukommen), als vielmehr durch die genotypische Kontrolle eines intrazellulären Substratpools. Ein Schwellenwert von 3...4mg PL/l Kulturfiltrat ließ sich in den durchgeführten Schüttelkolben-Kulturen und Fermentationen nicht überschreiten. Das Auffinden einer geeigneten Mutante mit nichtkontrollierenden Eigenschaften auf die PL-Biosynthese könnte ein erfolgreicher Ansatz zur Lösung dieses Problems sein.

Die durch Einsatz eines für die Pentalenolacton-Produktion optimalen Nährmediums (s. Tab. 9) und einer optimalen fermentativen Prozeß-Führung (73) biosynthetisierten und anschließend durch schonende Aufarbeitung (s. Abb. 2) isolierten fünf Pentalenolacton-Derivate konnten über die chemischen Analysen (s. 2.6) als Pentalensäure, Pentalenolacton H-Diol, Pentalenolacton F-Diol, Pentalenolacton-Epoxid und Pentalenolacton-Chlorhydrin identifiziert werden.

Das zweite wichtige Struktur-Element ist die am Lacton-Ring befindliche, jedoch in der Struktur variable Gruppe, die eine Epoxid-, Chlorhydrin-, α-Methylen (17)- und Diol-Gruppe darstellen kann. Die Stärke der Elektronegativität nimmt hierbei vom Chlorhydrin- über das Epoxid- zum Diol-Derivat ab und bestimmt das Ausmaß der GAPDH-Hemmwirkung (s. 2.7.2). Dies ist erkenntlich an der relativ schwachen GAPDH-Hemmwirkung des Pentalenolacton F-Diol (Faktor 100 schwächer) gegenüber dem Epoxid- und Chlorhydrin-Derivat. Durch eine Hydroxyl-Gruppe in Position C-1 des Pentalenolacton H-Diol tritt eine Verstärkung der GAPDH-Hemmwirkung auf, was eventuell auf ein drittes Zentrum für eine Pentalenolacton-Bindung hindeutet (Faktor 20 schwächer).
Nur eine untergeordnete Rolle bei der GAPDH-Hemmung dürfte der Lacton-Ring spielen, da Pentalensäure und das 7,8 Dimethyl-5-(α-Hydroxy-ß-Chlorethyl)-6-Bicyclo [3.3.0]-Octadien-(2.6)-3-Carbonsäure-Derivat, die keinen Lacton-Ring aufweisen, durchaus hemmaktiv sind, wogegen der Ameisen-Abwehrstoff D,L-Isoiridomyrmecin mit beschriebenen antibiotischen Eigenschaften (62) keinerlei GAPDH-Hemmaktivität zeigt.
Ebenfalls keine Hemm-Wirkung zeigt, wie zu erwarten, das reine Kohlenstoff-Gerüst des Pentalenen ohne jegliche funktionellen Gruppen.
Das Ausbleiben der $GAPDH_{rm}$-Hemmung des Pflanzen-Sesquiterpen-Lactons Isocomensäure ist überraschend, da aufgrund einer α,ß-ungesättigten Carbonsäure und des ähnlichen Kohlenstoff-Gerüstes im Hinblick auf die Pentalensäure-Struktur eine Inhibition möglich sein sollte. Jedoch zeigt sich im Vergleich der Struktur-Modelle von Pentalensäure zu Isocomensäure eine Spiegelbild-Isomerie, also enantiomeres Verhalten, sodaß ein Ausfall der $GAPDH_{rm}$-Hemmung trotz gleicher und für die Bindung wichtiger Struktur-Elemente erklärbar wird.

Die Verbindungen Pentalensäure und Pentalenolacton-Epoxid stellen Beginn und Ende der Biosynthese-Kette (23) dar und sind somit "natürliche" Produkte des Mikroorganismus Streptomyces arenae Tü 469. Dagegen sollte man die isolierten Diole (PL_d-H; PL_d-F) und PL_c unter dem Gesichtspunkt betrachten, daß sie laut verschiedener Arbeitsgruppen (5, 85) Aufarbeitungsartefakte darstellen, welche unter sauren Bedingungen im Kultur-Filtrat (s. Abb. 2) aus dem Epoxid-Derivat entstehen. Es bleibt aber ungeklärt, warum das Pentalenolacton-Chlorhydrin quantitativ gegenüber den Diolen überwiegt, da obwohl mit Phosphorsäure angesäuert, die Bildung der Diole bevorzugt sein sollte.

3.3 Bestimmung der für die GAPDH-Inhibition essentiellen Struktur-Elemente des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton

Das Auftreten fünf $GAPDH_{rm}$-hemmaktiver Pentalenolacton-Derivate erlaubte durch Ergänzung weiterer strukturell verwandter Verbindungen einen Vergleich der relativen $GAPDH_{rm}$-Hemmaktivitäten (s. 2.7.1), welche auf die strukturellen Bedingungen für eine GAPDH-Inhibition schliessen lassen (s. Tab.10).
Hierbei zeigen sich mindestens zwei strukturelle Zentren, die an einer GAPDH-Inhibition beteiligt sind.
Zum einen dürfte die α,ß-ungesättigte Carbonsäure bei der Bindung des Inhibitors PL an seinen Wirkort GAPDH notwendig sein, was durch Vergleich von PL_c zu seinem Methylester (Faktor 1000 schwächer) erkennbar ist. Ebenso zeigt sich die Wichtigkeit dieses Struktur-Elementes bei dem Vergleich zwischen Pentalensäure zu seinem Methylester.

Damit ist neben den notwendigen funktionellen Gruppen auch eine entsprechende Konformation des Inhibitors vorgeschrieben, die aus einer cis-Stellung des Lacton-Ringes resultiert und ein, für die Bindung und Inhibition optimales Zueinanderpassen von GAPDH und Pentalenolacton gewährleistet.
Die Ergebnisse, welche die unterschiedliche Reaktivität der Pentalenolacton-Derivate PL_c und PL_d-F aufzeigen, veranschaulichen eindeutig den Einfluß des elektronegativen Charakters der am Lacton-Ring befindlichen Gruppe (s. 2.7.2). Die Elektronegativität ist im Fall des Diol-Derivates deutlich schwächer ausgeprägt als bei dem Chlorhydrin-Derivat und bestimmt letztendlich die Stärke der Inhibitor-Wirkung (s. Abb.35) und die Kinetik der Reaktion zwischen $GAPDH_{rm}$ und dem Inhibitor (s. Abb.36).
Eine mögliche Reversibilität der Inhibitor-Wirkung von PL_d-F ist insofern auszuschließen, da die Bindung der α,β-ungesättigten Carbonsäure-Gruppierung als zweites reaktives Zentrum ausreicht, eine Hemm-Wirkung bei $GAPDH_{rm}$ durchzuführen und aufrechtzuerhalten (s. Tab.10).
Dies ist erkennbar daran, daß zum einen eine vollständige Aktivierung des PL_d-F-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparates durch ATP nicht gelingt (s. Abb.35). Zum anderen bringt eine Dialyse eines PL_d-F-modifizierten $GAPDH_{rm}$-Präparates keine Aktivierung des Enzyms, was auf eine Abspaltung des Inhibitors hingewiesen hätte.

Zusammenfassend darf man feststellen, daß die vom Actinomyceten Streptomyces arenae Tü 469 produzierten Sesquiterpen-Lactone der Pentalenolactone Parallelen im strukturellen Aufbau zu den von Pflanzen synthetisierten Sesquiterpen-Lactone (26, 27) zeigen.

Auch hier sind mindestens zwei für die GAPDH-Inhibition reaktive Zentren charakterisierbar und ähneln stark, den von Pflanzen synthetisierten "polyfunktionellen" Enzym-Inhibitoren, die als α,β-ungesättigte Carbonyl-Funktionen und α-Methylen-Lacton-Systeme identifiziert wurden (78, 86, 87).
Aufgrund starker Evidenzen darf vermutet werden, daß die irreversible Bindung des Inhibitors an seinen Wirkort über eine kovalente Bindung zwischen einem reaktiven Histidin-Rest innerhalb der GAPDH-Struktur mit dem am Lacton-Ring befindlichen stark elektronegativen Struktur-Element (Chlorhydrin oder Epoxid) erfolgt und eventuell durch ionische Wechselwirkung eines Arginin-Restes innerhalb der Substrat-Bindungsstelle des Enzyms mit dem Struktur-Element der α,β-ungesättigten Carbonsäure des Pentalenolactons gestützt wird.
Analoge Versuche, wie sie schon bei den von Pflanzen synthetisierten Sesquiterpen-Lactone mit reaktiven Cystein-Resten durchgeführt wurden (26, 75, 77), sind in Vorbereitung.

4. Literaturverzeichnis

(1) Weinberg, E.D.,
The concept of secondary metabolism;
Hirsch, C.F.,
Regulation of secondary metabolism in microorganism;
Demain, A.L.; Piret, J.M.,
Why secondary metabolism? in:
Microbiology, eds. D. Schlessinger, p. 356-366,
publ. by Amer.Soc.f.Microbiology, 1981

(2) Zähner, H.; Drautz, H.; Weber, H.,
Novel approaches to metabolite screening, in:
Bioactive microbial products, eds. J.D. Bu'Lock,
L.J. Nisbet, D.J. Winstanley, p. 51-70
publ. by Society for General Microbiology, 1982

(3) Newton, B.A.,
Mechanism of antibiotica action,
Ann.Rev.Microbiol. 19, p. 209, 1960

(4) Pruess, D.L.; Scannell, J.P.,
Antimetabolites from microorganism, in:
Adv.Appl.Microbiol. 17, eds. D. Perlman, p. 19-62,
1974

(5) Keller-Schierlein, W.; Lemke, J.; Nyfeler, R.;
Zähner, H.,
Stoffwechselprodukte in Mikroorganismen:
Arenaemycin E, D und C
Arch.Microbiol. 84, p. 301, 1972

(6) Lemke, J.,
Arenaemycin, ein Antibioticum aus Streptomyceten:
Untersuchungen zur Isolierung, Identifizierung
und Wirkungsweise,
Dissertation an der Universität Tübingen,

(7) Martin, D.G.; Slomp, G.; Miszak, S.; Duchamp, D.J.; Chidester, C.G.;
The structure and absolute configuration of pentalenolactone (PA 132),
Tetrahedron Letters 56, p. 4901, 1970

(8) Koe, B.K.; Sobin, B.A.; Celmer, W.D.,
PA 132, A new antibiotic, Part I:
Isolation and chemical properties,
Antibiotics Annual, p. 672, 1956-1957

(9) English, A.R.; McBride, T.J.; Lynch, J.E.,
PA 132, A new antibiotic, Part II:
In vitro and in vivo studies,
Antibiotics Annual, p. 676, 1956-1957

(10) Takeuchi, S.; Ogawa, Y.; Yonehara, H.,
The structure of pentalenolactone (PA 132)
Tetrahedron Letters 32, p. 2737, 1969

(11) Aizawa, S.; Akutsu, H.; Satomi, T.; Kawabata, S.; Sasaki, K.,
AA-57, A new antibiotic related to pentalenolactone,
J. Antibiotics 31, p. 729, 1978

(12) Danishefski, S.; Hirama, M.; Gombartz, K.; Harayama, T.; Berman, E.,
Stereospecific total synthesis of D,L-pentalenolactone,
J.Am.Chem.Soc. 100, p.6536, 1978

(13) Hartmann, S.; Neeff,J.; Heer, U.; Mecke, D.,
Arenaemycin (Pentalenolactone):
A specific inhibitor of glycolysis,
FEBS Letters 93, p. 339, 1978

(14) Seto, H.; Yonehara, H.,
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone,
Part III: Isolation of a biosynthetic intermediate
hydrocarbon, pentalenene,
J. Antibiotics 33, p. 92-93, 1980

(15) Seto, H.; Sasaki, T.; Uzawa, J.; Takeuchi, S.;
Yonehara, H.,
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone,
Part II: Isolation of pentalenic acid and
pentalenolactone H,
Tetrahedron Letters 45, p. 4411-4412, 1978

(16) Seto, H.; Sasaki, H.; Yonehara, H.; Uzawa, J.,
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone,
Part I: Application of long range selective proton
decoupling (LSPD) and selective ^{13}C-^{1}H NOE in the
structure elucidation of pentalenolactone G,
Tetrahedron Letters 10, p. 923-926, 1978

(17) Cane, D.E.; Rossi, T.,
The isolation and structure elucidation of
pentalenolactone E,
Tetrahedron Letters 32, p. 2973-2974, 1979

(18) Paquette, L.A.; Schostarez, H.; Annis, G.D.,
Total synthesis of (+)-pentalenolactone E methylester,
J.Am.Chem.Soc. 103, p. 6526-6527, 1981

(19) Tillman, A.M.; Cane, E.D.,
Pentalenolactone F, A new metabolite isolated
from Streptomyces: Isolation and structure elucidation,
J. Antibiotics 36, p. 170-172, 1983

(20) Cane, E.D.; Rossi, T.; Pachlatko, J.P.,
The biosynthesis of pentalenolactone,
Tetrahedron Letters 38, p. 3639-3642, 1979

(21) Cane, E.D.; Rossi, T.; Tillman, A.M.; Pachlatko, J.P.,
Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis:
Biosynthesis of pentalenolactone from (U-$^{13}C_6$)-
Glucose and (6-$^{2}H_2$)-Glucose,
J.Am.Chem.Soc. 103, p. 1838-1843, 1981

(22) Cane, E.D.; Tillman, A.M.,
Pentalenene biosynthesis and the enzymatic
cyclization of farnesylpyrophosphate,
J.Am.Chem.Soc. 105, p. 122-124, 1983

(23) Ohtsuka, T.; Shirahama, H.; Matsumoto, T.,
Synthesis of pentalenolactone E and F through
biogenetic like cyclization of humulene,
Tetrahedron Letters 36, p. 3851-3854, 1983

(24) Duszenko, M.; Balla, H.; Mecke, D.,
Specific inactivation of glucose metabolism
from eucaryontic cells,
Biochimica et Biophysica Acta 714, p. 344-350, 1982

(25) Maurer, K.H.; Pfeiffer, F.; Zehender, H.; Mecke, D.,
Chracterization of two glyceraldehyde-3-phosphate
dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone
producer Streptomyces arenae,
J. Bacteriology 153, p. 930-936, 1983

(26) Kupchan, M.S.,
Recent advances in the chemistry of tumor
inhibitors of plant origin,
Trans.N.Y.Acad.Sci. 32, p.85, 1970

(27) Rodriguez, E.; Towers, G.H.N.; Mitchell, J.C.,
Biological activities of sesquiterpene lactones,
Phytochemistry 15, p. 1573-1579, 1976

(28) Harris, J.I.; Waters, M.,
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in:
Comprehensive Biochemistry 14, eds. M. Florkin
and E.H. Stotz, p. 1-49, 1966

(29) Hartmann, S.,
Arenaemycin (Pentalenolacton):
Ein selektiver Inhibitor der Glykolyse,
Dissertation der Universität Tübingen,
Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1979

(30) Hütter, R.,
Systematik der Streptomyceten,
Bibl. Microbiol. 6, Karger-Verlag, Basel, 1967

(31) Hasenböhler, A.,
Instrumentierung von Fermentationsanlagen,
Dissertation der Universität Tübingen,
Fachbereich Biologie, 1978

(32) Bergmeyer, H.U.,
Methoden der enzymatischen Analyse,
Bd.Iu.II, 3.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 1974

(33) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
Protein measurement with the Folin phenol reagent,
J.Biol.Chem. 193, p. 265-275, 1951

(34) Sund, H.,
Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases,
Proceedings of an advanced study institute
held at the university of Konstanz, Germany,
p. 57-70, 1970

(35) Nagradova, N.K.; Asryants, R.A.; Benkevich, N.V.,
The role of arginine residues in the function of D-glycerladehyde-3-phosphate dehydrogenase,
Biochimica et Biophysica Acta 527, p. 319-326, 1978

(36) DeVijlder, J.J.M.; Slater, E.C.,
The reaction between NAD^+ and rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
Biochimica et Biophysica Acta 167, p. 23-34, 1968

(37) Weber, K.; Osborn, M.,
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,
J.Biol.Chem. 244, p. 4406, 1969

(38) Firmenschrift der Firma Serva, Heidelberg

(39) Smyth, D.G.,
Techniques in enzymic hydrolysis, in:
Meth.of Enzymology XI, eds. C.H.W. Hirs,
p. 214-222, 1967

(40) Mitchell, W.M.; Harrington, W.F.,
Clostripain, in:
Meth. of Enzymology XIX, eds. G.E. Perlman and L. Lorand, p. 635-642, 1970

(41) Epstein, J.C.; Carter, M.M.; Goldberger, F.R.,
Reversible denaturation of rabbit muscle lactate dehydrogenase,
Biochimica et Biophysica Acta 92, p. 388-391, 1964

(42) Furfine, C.S.; Velick, S.F.,
The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction,
J.Biol.Chem. 240, p. 844-855, 1965

(43) Ellmann, G.L.,
Tissue sulfhydryl groups,
Arch.Biochem.Biophys. 82, p. 70-77, 1959

(44) Janatova, J.; Fuller, J.K.; Hunter, M.J.,
The heterogenity of bovine albumin with
respect to sulfhydryl and dimer content,
J.Biol.Chem. 243, p. 3612-3622, 1968

(45) Benesch, R.; Benesch, R.E.,
Determination of -SH-roups in proteins, in:
Methods of Biochemical Analysis X, eds. D. Glick,
p. 43-70, 1962

(46) Habeeb, A.F.S.A.,
Determination of free amino groups in proteins
by trinitrobenzenesulfonic acid,
Anal.Biochem. 14, p. 328-336, 1966

(47) Ronchi, S.; Zapponi, M.C.; Ferri, G.,
Inhibition by pyridoxal-phosphate of
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
Eur.J.Biochem. 8, p. 325-331, 1969

(48) Porcina, E.G.; Ferri, G.; Zapponi, M.C.; Ronchi, S.,
Identification of lysines reactive with pyridoxal-5'-
phosphate in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
Eur.J.Biochem. 20, p. 535-540, 1971

(49) Nagradova, N.K.; Asryants, R.A.; Benkevich, M.V.;
Safronova, M.I.,
Functional arginine residues of D-glyceraldehyde-
3-phosphate dehydrogenase from rat skeletal muscle,
FEBS Letters 69, p. 246-248, 1976

(50) Vospelnikova, N.D.; Safronova, M.I.; Shuvalova, E.R.; Baratova, L.A.; Kniazev, S.P.; Nagradova, N.K., Identification of an arginine residue important for catalytic activity in the primary structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Biochem.J. 199, p. 757-765, 1981

(51) Riordan, J.F., Arginyl residues: Anion recognition sites in enzymes, Science 195, p. 884-885, 1977

(52) Leocini, G.; Maresca, M.; Ronchi, S.; Bonsignore, A., Studies on the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by methylglyoxal, Experientia 37, p. 443-444, 1981

(53) Muronetz, V.I.; Golovina, T.G.; Nagradova, N.K., Rat skeletal muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Adenine nucleotide-induced inactivation, Arch.Biochem.Biophys. 177, p. 16-23, 1976

(54) Oguchi, M.; Meriwether, B.P.; Park, J.H., Interaction between adenosine triphosphate and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, J.Biol.Chem. 248, p. 5562-5570, 1972

(55) Constantinides, S.M.; Deal, W.C., Reversible dissociation of tetrameric rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase into dimers or monomers by adenosine triphosphate, J.Biol.Chem. 244, p. 5695-5702, 1969

(56) Rasched, I.; Bayne, S., Specific modification of a single cysteine residue in both bovine liver glutamate dehydrogenase and yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Biochimica et Biophysica Acta 707, p. 267-272, 1982

(57) Zygmunt, W.A.,
Oxytetracycline formation by Streptomyces rimosus
in chemically defined media,
Appl.Microbiol. 9, p. 502-507, 1961

(58) Horikoshi, K.; Iida, S.; Ikeda, Y.,
Mannitol and mannitol dehydrogenase in conidia
of Aspergillus oryzae,
J.Bact. 89, p. 326-330, 1965

(59) Ohfune, Y.; Shirahama, H.; Matsumoto, T.,
Formolysis of protoilludyl cation equivalents:
A new mode of rearrangement of Bicyclo[4.2.0]
Oct-2-Yl-cation,
Tetrahedron Letters 33, p. 2869-2872, 1976
sowie einer persönlichen Mitteilung von Prof. H. Shirahama

(60) Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Ahmed, M.; Schuster, A.,
Sesquiterpene lactones and other constituents
from Schistostephium species,
Phytochemistry 7, p. 1623-1636, 1983

(61) Stumper, R.,
Die Giftsekretion der Ameisen,
Die Naturwissenschaften 47, Heft 20, p. 457-463, 1960

(62) Cavill, G.W.K.; Ford, D.L.; Locksley, H.D.,
Aust.J.Chem. 10, p. 352, 1957

(63) Clark, K.J.; Fray, G.I.; Jaeger, R.H.; Robinson, R.,
Synthesis of D- and L-Isoiridomyrmecin and related
compounds,
Tetrahedron 6, p. 217-224, 1959

(64) Fales, H.M.; Jaouni, T.M.; Babashak, J.F.,
Simple device for preparing ethereal diazomethane without resorting to codestillation,
Anal.Chem. 45, p. 2302, 1973

(65) Houben-Weyl,
Methoden der organischen Chemie:
Sauerstoffverbindungen I,
Bd. IV/2, 4.Auflage, hrsg. E. Müller,
G.Thieme Verlag, Stuttgart, p. 785, 1963

(66) Velick, S.F.; Furfine, C.,
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in:
The Enzymes Vol.7, p. 247-248, 1963

(67) Mann, K.-H.; Mecke, D.,
Inhibition of spinach GAPDH by pentalenolactone,
Nature 282, p. 535, 1979

(68) Harris, J.I.; Perham, R.N.,
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle,
Nature 219, p. 1025-1028, 1968

(69) Buehner, M.; Ford, C.G.; Moras, D.; Olson, K.W.,
Rossmann, M.G.,
Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
J.Mol.Biol. 90, p. 25-49, 1974

(70) Olson, E.J.; Park, J.H.,
Studies on the mechanism and active site for the esterolytic activity of 3-phospho-glyceraldehyde dehydrogenase,
J.Biol.Chem. 239, p. 2316-2327, 1964

(71) Martin, J.F.,
Control of antibiotic synthesis by phosphate,
Adv.Biochem.Eng. 6, p. 105-127, 1977

(72) Maurer, K.-H.,
in Vorbereitung

(73) Lehmann, J.,
Vergleichstest für Fermentationen, in:
Arbeitsmethoden für die Biotechnologie,
hrsg. DECHEMA, Frankfurt a.M., 1982

(74) Lehmann, J.,
in Vorbereitung

(75) Lee, K.H.; Hall, J.H.; Mar, E.C.,
Sesquiterpene antitumor agents:
Inhibitors of cellular metabolism,
Science 196, p. 533-536, 1977

(76) Smith, C.M.; Larner, J.; Thomas, A.M.; Kupchan, S.M.,
Inactivation of glycogen synthase by the tumor
inhibitor vernolepin,
Biochimica et Biophysica Acta 276, p. 94-104, 1972

(77) Hanson, R.W.; Lardy, H.A.,
Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide
and α-methylene lactone tumor inhibitors,
Science 168, p. 378-380, 1970

(78) Kupchan, M.S.; Fessler, D.C.; Eakin, A.M.,
Giacobbe, T.J.,
Reactions of alpha methylene lactone tumor
inhibitors with model biological nucleophiles,
Science 168, p. 376-377, 1970

(79) Jones, B.J.; Young, M.J.,
Carcinogenicity of lactones III:
The reactions of unsaturated γ-lactones
with L-Cysteine,
J.Med.Chem. 11, p. 1176-1182, 1968

(80) Mathew, E.; Meriwether, B.P.; Park, J.H.,
The enzymatic significance of S-acetylation
and N-acetylation of 3-phosphoglyceraldehyde
dehydrogenase,
J.Biol.Chem. 242, p. 5024-5033, 1967

(81) Biesecker, G.; Harris, I.J.; Thierry, J.C.;
Walker, J.E.; Wonacott, A.J.,
Sequence and structure of D-glyceraldehyde-
3-phosphate dehydrogenase from Bacillus
stearothermophilus,
Nature 266, p. 328-333, 1977

(82) Bu'Lock, J.D.,
Secondary metabolism in fungi and its relationships
to growth and development, in:
The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry,
Edward Arnold Limited, London, p. 33-58, 1975

(83) Righelato, R.C.,
Growth kinetics of mycelial fungi, in:
The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry,
Edward Arnold Limited, London, p. 79-103, 1975

(84) Berry, D.R.,
The environmental control of the physiology
of filamentous fungi, in:
The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry,
Edward Arnold Limited, London, p. 16-32, 1975

(85) Seto, H.; Sasaki, T.; Yonehara, H.; Takahashi, S.; Kuwano, H.; Arai, M.,
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone, Part IV: Structures of pentalenolactone O and P,
Annual Meet. Agr. Chem. Soc. Jap., p. 473, 1980

(86) Kupchan, M.S.; Eakin, M.A.; Thomas, A.M.,
Tumor-inhibitors 69. Structure-Cytotoxity Relationships among the sesquiterpen lactones,
J.Med.Chem. 14, p. 1147-1152, 1971

(87) Lee, K.H.; Ibuka, T.; Wu, R.Y.; Geissmann, T.A.,
Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds,
Phytochemistry 16, p. 1177-1181, 1977

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie	: K. Mörike
Anorganische Chemie	: W. Rüdorff, E. Müller
Biochemie	: G. Weitzel, D. Mecke
Botanik	: W.E. Mayer
Mathematik	: H. Pommer
Mikrobiologie	: V. Braun, H. Zähner
Molekularbiologie	: P. Hausen, H. Probst
Organische Chemie	: E. Bayer
Pflanzenphysiologie	: H. Metzner
Physik	: H. Krüger
Physikalische Chemie	: H. Mauser, W. Braun
Physikalische Biochemie	: K. Wegmann, A. Wendel
Physiologie	: E. Betz
Zoologie	: K. Grell

L E B E N S L A U F

Name	:	Dietmar Zdunek
geb. am	:	20.061949
Geburtsort	:	Gladbeck/NRW
Ausbildung	:	
1955 - 1960		Grundschule Gladbeck
1960 - 1966		Realschule Gladbeck Abschluß: Mittlere Reife
1966 - 1969		Ausbildung zum Chemie-Laborant bei der Chemische Werke Hüls AG Abschluß: Gehilfen-Brief
1969 - 1972		Ingenieur-Studium an der Fachhochschule Münster Abschluß: Chemie-Ingenieur, grad.
1972 - 1974		Dienstzeit bei der Bundeswehr
1974 - 1979		Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Abschluß: mündliche Diplom-Prüfung
1979 - 1980		Anfertigung der Diplom-Arbeit am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Optimierung des Verfahrens zur Fermentation und Aufarbeitung von Pentalenolacton aus Streptomyces arenae Tü 469" Abschluß: Diplom-Biochemiker
1980 - 1984		Promotion bei Prof.Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Wirkungsmechanismus, Spezifität und Bindungsstelle des Glykolyse- Inhibitors Pentalenolacton"

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353